

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Utilidad del selenio plasmático como biomarcador en
enfermedad renal crónica avanzada**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Aránzazu Anadón Ruiz

DIRECTORES

Victoria Seijas Martínez-Echevarría

Rafael Lozano Fernández

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Utilidad del selenio plasmático como
biomarcador en enfermedad renal
crónica avanzada**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Aránzazu Anadón Ruiz

Directores

**VICTORIA SEIJAS MARTÍNEZ-ECHEVARRÍA
RAFAEL LOZANO FERNÁNDEZ**

Madrid, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



Utilidad del selenio plasmático como biomarcador en enfermedad renal crónica avanzada

Memoria para optar al grado de doctora presentada por

Aránzazu Anadón Ruiz

Bajo la dirección de los doctores:

VICTORIA SEIJAS MARTÍNEZ-ECHEVARRÍA

RAFAEL LOZANO FERNÁNDEZ

Madrid, 2019



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. ARÁNZAZU ISABEL ANADÓN RUIZ,
estudiante en el Programa de Doctorado FARMACIA,
de la Facultad de Farmacología de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

UTILIDAD DEL SELENIO PLASMÁTICO COMO BIOMARCADOR EN
ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA AVANZADA

y dirigida por: RAFAEL LOZANO FERNÁNDEZ Y MARÍA VICTORIA SEIJAS
MARTÍNEZ-ECHEVARRÍA

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 8 de julio de 2019

ANADON RUIZ
ARANZAZU
ISABEL -
Fdo.: **44834913R**

Firmado digitalmente
por ANADON RUIZ
ARANZAZU ISABEL
- 44834913R
Fecha: 2019.07.08
13:41:41 +02'00'

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

A mis padres

Agradecimientos

Quiero expresar mi gratitud, en primer lugar, a Victoria Seijas, por su dedicación, su experiencia, su visión crítica y por sus ánimos y confianza durante todo el proceso de elaboración de esta tesis. El agradecimiento se extiende a todo lo que me ha aportado en el terreno personal y profesional desde que inicié la residencia bajo su tutela en el año 2007.

A Rafa Lozano, por su apoyo y asesoramiento en la realización de esta tesis, por su paciencia a lo largo del proceso y por hacer que parezca sencillo el complejo aunque necesario camino administrativo.

A Jose Cocho y Pilar Bermejo, porque con su intervención el proyecto salió adelante en un momento en que parecía abocado al abandono. A ellos agradezco también muchas enseñanzas y consejos desde que era una estudiante de 5º de carrera y a lo largo de mi desarrollo profesional.

A Paloma Herbello por su experiencia y su inestimable ayuda en la optimización del método de determinación de selenio en el equipo Perkin-Elmer.

Al grupo de GETEE de la USC por su calor y acogida.

A Elena Martín por su imprescindible contribución a la creación de la base de datos.

A Ramón Novoa por los inolvidables 600 Km juntos trasladando muestras.

A la población con ERC del área de Leganés, entre los que se encontraron los sujetos anónimos cuyos datos se analizaron en esta tesis doctoral.

A toda la plantilla del servicio de análisis clínicos del Hospital Severo Ochoa, donde inicié este proyecto. A todos los técnicos, facultativos y jefa de servicio y, en especial, a mis compañeras residentes Rita Martínez, Raquel Jáñez, Ana Andrino y Ester Mena, por hacer de la residencia una experiencia enriquecedora en el ámbito profesional y, sobre todo, en el personal.

A mi familia, por su cariño y su apoyo continuo. A mis padres, por su ejemplo de dedicación a la ciencia. A mis hermanas, Soluca y Ana, porque estamos juntas en la lucha diaria.

A Santi, por su amor y compañía, por haberme escuchado y leído, y porque seguirá haciéndolo en éste y en futuros proyectos.

Abreviaturas y acrónimos

AAN: análisis de activación neutrónica

AEE: agentes estimulantes de la eritropoyesis

AINEs: antiinflamatorios no esteroideos

ARA-II: antagonistas del receptor de la angiotensina II

CKD-EPI: *Chronic Kidney Disease-Epidemiology Collaboration*

ClCr semanal: aclaramiento peritoneal semanal de creatinina

CV: coeficiente de variación

D/P creatinina: relación de concentración dializado/plasma de creatinina

DE: desviación estándar

DIO: yodotironina desyodasas

DM: diabetes mellitus

DP: diálisis peritoneal

DPE: desgaste proteico-energético

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ERC: enfermedad renal crónica

ETAAS: espectrometría de absorción atómica electrotérmica

FGe: filtrado glomerular estimado

GPx: glutatión peroxidasas

HD: hemodiálisis

HGAAS: espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros

HR: *hazard ratio*, cociente de riesgo

HTA: hipertensión arterial

IC: intervalo de confianza

ICP-MS: espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo

IECA: inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina

IMC: índice de masa corporal

K/DOQI: *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*

KDIGO: *Kidney Disease Improving Global Outcomes*

LOAEL: nivel mínimo de efecto tóxico observable

MDRD: *Modification of Diet in Renal Disease*

mOR: *median odds ratio*, mediana de razón de probabilidades

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NHANES: *National Health and Nutrition Examination Survey*

NOAEL: nivel sin efecto adverso observable

OR: *odds ratio*, razón de probabilidades

PCR: proteína C reactiva

PCRn: índice de catabolismo proteico normalizado

PI: *prognostic index*, valor predicho del predictor lineal

PTH: hormona paratiroidea

RERI: estadístico de exceso de riesgo relativo debido a interacción

RIC: rango intercuartílico

RR: riesgo relativo

SBP2: *secis binding protein 2*

Se-Met: selenometionina

Sec: selenocisteína

SelP: selenoproteína P

SelS: selenoproteína S

SNPs: polimorfismos de un solo nucleótido

SPS2: selenofosfato sintetasa 2

SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TrxR: tiorredoxina reductasas

Tabla de contenidos

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	11
TABLA DE CONTENIDOS	14
1 RESUMEN.....	20
2 ABSTRACT	25
3 INTRODUCCIÓN.....	31
3.1 Selenio: bioinorgánica y bioquímica.....	32
3.1.1 Del suelo a las proteínas.....	32
Selenio en suelos	32
Incorporación de selenio en especies vegetales	33
Metabolismo en plantas.....	34
Incorporación de selenio en animales.....	35
Incorporación de selenio en humanos	35
Metabolismo en humanos y otros mamíferos	36
3.1.2 Selenoproteínas.....	37
Síntesis de selenoproteínas	37
Selenoproteínas humanas	38
Glutación peroxidasas.....	39
Tiorredoxina reductasas.....	39
Yodotironina desyodasas	39
Selenoproteína P.....	40
3.1.3 El selenio como elemento esencial.....	42
Déficit de selenio	42
Toxicidad de selenio.....	42
Requerimientos nutricionales	43
Corrigiendo la carencia de selenio	45
3.1.4 Selenio y enfermedad. Evidencia actual.....	46
Mortalidad	46
Cáncer.....	47
Enfermedad cardiovascular.....	49
Función inmunitaria.....	49
3.1.5 Polimorfismos de selenoproteínas y enfermedad	50

3.2	Enfermedad renal crónica	51
3.2.1	Lesión renal.....	51
3.2.2	Estadía je.....	52
3.2.3	Factores de riesgo.....	53
3.2.4	Etiología	54
3.2.5	Tratamiento	55
3.2.6	Enfermedad renal crónica avanzada.....	55
3.2.7	Tratamiento sustitutivo.....	56
	Hemodiálisis.....	56
	Diálisis peritoneal	57
3.3	Determinación de selenio en plasma o suero.....	58
3.3.1	Espectrometría de absorción atómica en cámara electrotérmica.....	58
3.3.2	Obtención y almacenaje de las muestras	59
3.3.3	Preparación de las muestras.....	59
3.3.4	Medición.....	59
3.3.5	Modificación química.....	60
3.3.6	Programa de temperaturas	60
4	OBJETIVOS	63
5	MATERIAL Y MÉTODOS	65
5.1	Valores de referencia en suero.....	65
5.2	Población de estudio	65
5.2.1	Estudio preliminar de pacientes en diálisis peritoneal.....	65
	Estimación del tamaño muestral	66
5.2.2	Estudio observacional de cohortes retrospectivo	67
5.3	Variables recogidas	68
5.3.1	Variables epidemiológicas	68
5.3.2	Variables analíticas.....	68
5.4	Muestras	68
5.5	Sistemas analíticos, métodos y reactivos	69
5.5.1	Analizadores.....	69
5.5.2	Métodos y reactivos de los autoanalizadores.....	69
5.5.3	Reactivos para la determinación de selenio	77

5.6	Análisis estadístico	77
6	RESULTADOS.....	81
6.1	Desarrollo de un método de determinación de selenio en suero en un equipo	
VARIAN	81	
6.1.1	1ª fase	81
	Optimización de la etapa de secado	82
	Optimización de la etapa de calcinación.....	84
	Optimización de la etapa de atomización.....	86
	Programa de temperaturas al final de la 1ª fase.....	86
	Altura de pico vs. área de pico	87
	Adición estándar vs. calibración acuosa.....	88
6.1.2	2ª fase	90
	Controles con concentración certificada de selenio	90
	Modificador de paladio y magnesio	90
	Reducción de paladio con ácido ascórbico	91
6.1.3	Validación del método de medición de selenio.....	93
	Intervalo de trabajo y linealidad	93
	Límite de detección y límite de cuantificación	96
	Ausencia de efecto matriz.....	96
	Exactitud y precisión.....	96
6.2	Optimización de un método de determinación de selenio en suero en un	
equipo Perkin-Elmer	100	
	Optimización de la temperatura de calcinación.....	101
	Optimización de la temperatura de atomización.....	101
	Repetibilidad.....	102
	Método de calibración	102
	Límite de detección y límite de cuantificación	105
	Ausencia de efecto matriz.....	105
	Exactitud y precisión.....	106
6.3	Valores de referencia de selenio en suero	109
6.3.1	Partición de valores de referencia	110
6.4	Estudio preliminar de pacientes en diálisis peritoneal.....	113
6.4.1	Comparación con grupo control	113
6.4.2	Comparación con intervalo de referencia.....	114
6.5	Estudio observacional de cohortes retrospectivo.....	115

6.5.1	Descripción de la cohorte.....	115
	Variables epidemiológicas.....	118
	Variables analíticas.....	119
	Supervivencia a los cinco años desde la analítica	120
6.5.2	Selenio plasmático en la cohorte de pacientes.....	122
	Comparación con sujetos sanos	122
	Comparación con intervalo de referencia en población sana	123
6.5.3	Selenio y mortalidad	124
	Análisis global de la cohorte.....	124
	Verificación del modelo.....	128
	Análisis en subgrupo de pacientes en tratamiento sustitutivo.....	130
	Verificación del modelo.....	134
6.5.4	Selenio y tratamiento crónico con estatinas.....	137
	Comparación entre grupos mediante prueba de Mann-Whitney	137
	Comparación de la frecuencia de hiposelenemia entre grupos.....	138
	Odds Ratio de hiposelenemia en tratamiento crónico con estatinas.....	139
6.5.5	Selenio y otras variables bioquímicas.....	140
	Correlaciones bivariadas	140
	Análisis de regresión logística	142
	Análisis de supervivencia.....	145
	Verificación del modelo.....	146
7	DISCUSIÓN	150
7.1	Desarrollo, validación y optimización de métodos de determinación de selenio por ETAAS.....	151
7.2	Valores de referencia de selenio en suero	154
7.3	Selenio en enfermedad renal crónica avanzada.....	157
7.3.1	Selenio, candidato a marcador de desgaste proteico-energético	159
7.3.2	Selenio y tratamiento crónico con estatinas.....	162
7.3.3	Selenio y mortalidad	165
8	CONCLUSIONES.....	170
9	BIBLIOGRAFÍA	173
10	ÍNDICE DE TABLAS.....	187

11	ÍNDICE DE FIGURAS	190
12	COMUNICACIONES Y PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS DOCTORAL	192

1.ABSTRACT

1 Resumen

Introducción

El selenio es un elemento traza esencial para mamíferos, otros animales y muchas bacterias, formando parte de numerosas enzimas o selenoproteínas. Éstas tienen funciones antioxidantes, regulatorias de la función tiroidea o del sistema inmune. El selenio está presente en el sitio activo de estas enzimas en la forma de selenocisteína.

El consumo de selenio en la dieta varía ampliamente entre distintas zonas geográficas debido a la distinta disponibilidad de este elemento en los suelos. La absorción del selenio de la dieta no está regulada y tiene una alta biodisponibilidad (> 50%).

La toxicidad por selenio es rara y ocurre cuando hay una toma excesiva en la dieta, ya sea de forma natural en zonas geográficas con exceso de selenio en los suelos o por la ingesta de suplementos con altas dosis. Puede ocurrir una deficiencia de este elemento como consecuencia de una enfermedad, una terapia o una ingesta deficiente y crónica. Los riñones tienen un papel importante en la homeostasis del selenio y acumulan la mayor cantidad de este elemento. La isoforma plasmática de la glutatión peroxidasa se sintetiza principalmente en las células tubulares proximales renales.

Diversos autores han encontrado niveles bajos de glutatión peroxidasa y de selenio en componentes sanguíneos de pacientes con enfermedad renal crónica (ERC). Entre los mecanismos propuestos para explicar la alteración en el selenio de los pacientes con ERC está una ingesta disminuida, pérdidas urinarias o dialíticas, absorción intestinal impedida, unión anormal a proteínas o terapias farmacológicas.

El desgaste proteico-energético (DPE) y la inflamación crónica en el enfermo renal se relacionan con un aumento de la mortalidad, así como con la aparición de anemia refractaria y alteraciones en el metabolismo óseo-mineral.

En la actualidad, no hay evidencia suficiente para recomendar la suplementación de vitaminas y oligoelementos en pacientes con ERC o con ERC avanzada. La última guía europea de *European Renal Best Practice* recoge que no deberían usarse

suplementos de selenio, a menos que haya clínica compatible con déficit, en cuyo caso debe monitorizarse estrechamente.

Entre los marcadores bioquímicos habitualmente monitorizados en ERC se encuentran la albúmina, la creatinina, la prealbúmina y el colesterol séricos, que se emplean en la valoración del estado nutricional. La PCR es un marcador de inflamación que predice con precisión mortalidad en ERC avanzada, y la hemoglobina es el marcador de anemia más empleado en la toma de decisiones. Hasta la fecha, no se ha acumulado evidencia suficiente para establecer la utilidad del selenio sérico o plasmático como biomarcador en ERC.

Objetivos

El objetivo principal de esta tesis doctoral es el estudio de la utilidad del selenio sérico o plasmático como biomarcador en pacientes con ERC en fase de prediálisis y en tratamiento sustitutivo con alguna modalidad de diálisis. Para llevarlo a cabo se pone a punto y se valida un método de determinación de selenio en suero y plasma, se establece el intervalo de referencia del selenio en adultos del área geográfica, se estudia la relación del selenio con la supervivencia de los pacientes, se analizan las asociaciones entre el selenio y los marcadores bioquímicos que se emplean en el seguimiento en ERC y se compara el selenio sérico o plasmático de los pacientes agrupados según estén a tratamiento crónico con estatinas o no.

Material y métodos

Se llevó a cabo un estudio observacional transversal retrospectivo que incluyó 102 plasmas o sueros de pacientes con ERC en estadios 4 y 5 y 118 de sujetos control. Se midieron selenio y marcadores bioquímicos de nutrición, inflamación y otras comorbilidades. Se recogieron datos demográficos y epidemiológicos, así como los datos de mortalidad en un periodo de entre 5 y 6 años.

Se empleó un espectrofotómetro de absorción atómica electrotérmica (ETAAS) de la casa VARIAN para desarrollar y validar un método de determinación de selenio, utilizado en el estudio preliminar de selenio en pacientes en diálisis peritoneal.

Se empleó un espectrofotómetro ETAAS de Perkin-Elmer para optimizar un método de determinación de selenio que se empleó en el estudio observacional retrospectivo.

Se estimó el intervalo de referencia de selenio en adultos del área geográfica mediante el método no paramétrico basado en percentiles. Se estimó la necesidad de partición del intervalo de referencia mediante test z y test t de Student.

Las comparaciones se realizaron mediante U de Mann-Whitney, ANOVA y chi-cuadrado. Las correlaciones se estimaron mediante Rho de Spearman. Se utilizó el método no paramétrico de Kaplan-Meier para estimar las supervivencias y la regresión de Cox para el cálculo de *Hazard Ratios* (HR). Se analizó la asociación entre selenio y el uso de estatinas mediante regresión logística binaria.

Se obtuvo la aprobación del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Hospital Universitario Severo Ochoa para la realización del estudio observacional retrospectivo.

Resultados

El método de medición de selenio desarrollado en un equipo VARIAN tuvo unas imprecisiones intermedias de 5,8% y 4,7% y sesgos de 1% y -0,9%.

El método de medición de selenio optimizado en un equipo Perkin-Elmer tuvo una imprecisión intermedia de 4,4% y sesgo de 0,09%.

El intervalo de referencia del selenio sérico o plasmático en adultos fue 63 - 118 $\mu\text{g/L}$. Se descartó la necesidad de partición de los valores de referencia por sexo o edad ($z_{\text{sexo}}=1,92$ y $z_{\text{edad}}=0,36$, inferiores a $z^*=2,10$).

La mediana de selenio en la cohorte de pacientes fue de 61,6 µg/L y en el grupo control fue de 89,3 µg/L. La diferencia entre ambos grupos fue significativa ($p < 0,001$). El 52% de los pacientes tenían hiposelenemia.

La mediana de seguimiento de la cohorte de pacientes fue de 72 meses. Al final del estudio había fallecido el 48,5% de los pacientes. La supervivencia media fue de 46,2 meses para los pacientes con hiposelenemia (IC 95% 39,2 – 53,3 meses) y de 61,8 meses para el resto (IC 95% 55,6 – 68,0 meses). La diferencia fue estadísticamente significativa ($p = 0,000$). El HR de mortalidad del grupo de hiposelenemia versus el resto de pacientes fue de 2,585 (IC 95% 1,324 – 5,048), según un modelo de Cox ajustado por edad, tratamiento sustitutivo e historia de cardiopatía isquémica.

En la subcohorte de pacientes en tratamiento sustitutivo renal (85 pacientes), la supervivencia media fue de 45,4 meses con hiposelenemia (IC 95% 38,0 – 52,8 meses) y de 59,8 meses para el resto (IC 95% 51,9 – 67,8 meses). La diferencia fue estadísticamente significativa ($p = 0,000$). Al final del estudio, había fallecido el 67,3% de los pacientes con hiposelenemia y el 25% de los pacientes con normo o hiperselenemia. El HR de mortalidad con hiposelenemia fue HR = 2,952 (IC 95% 1,402 – 6,217).

Los pacientes en tratamiento crónico con estatinas tuvieron una mediana de selenio plasmático de 65,2 µg/L, (RIC = 55,8 – 77,5 µg/L), significativamente superior ($p = 0,010$) a la de los pacientes que no estaban en tratamiento (57,0 µg/L, RIC = 46,3 – 68,8 µg/L).

El selenio se correlacionó con la albúmina ($Rho=0,440$), el colesterol ($Rho=0,278$) y la creatinina ($Rho=0,367$) en la subcohorte de pacientes en diálisis, mientras que no hubo correlación significativa en el grupo control. La clasificación en función de la hiposelenemia llevó a dos grupos con diferencia significativa en el tiempo en diálisis ($p=0,018$), la albúmina ($p=0,003$), la creatinina ($p=0,004$), el colesterol ($p=0,038$) y el fosfato ($p=0,025$). El HR de mortalidad con hiposelenemia fue de 3,403 (IC 95% 1,592 – 7,275) según un modelo ajustado por edad e hipoalbuminemia (albúmina sérica $< 3,8$ mg/dL).

Conclusiones

Se desarrolló un método de medición de selenio en suero y plasma en un equipo VARIAN con adecuada exactitud y precisión. Se optimizó un método de determinación de selenio en un equipo Perkin-Elmer con adecuada exactitud y precisión.

El intervalo de referencia del selenio sérico o plasmático de la población adulta del área de Leganés es 63 – 118 µg/L. No son necesarios intervalos de referencia del selenio sérico o plasmático segregados ni por sexo ni por edad.

El selenio plasmático de los pacientes con ERC avanzada es significativamente inferior al de los sujetos control. El 52,0% de los pacientes tiene hiposelenemia. En la subcohorte de pacientes en diálisis, este porcentaje es del 57,6%.

La supervivencia media estimada del grupo de pacientes con hiposelenemia es significativamente menor a la del grupo con normo o hiperselenemia, tanto en la cohorte global como en la subcohorte en diálisis.

La hiposelenemia tiene un HR de mortalidad de 2,585, según un modelo de Cox que incluye las covariables edad, tratamiento sustitutivo e historia de cardiopatía isquémica. En la subcohorte en diálisis, la hiposelenemia tiene un HR de mortalidad de 2,952, según un modelo de Cox que incluye las covariables edad, tratamiento sustitutivo e historia de enfermedad cardiovascular. El HR de mortalidad es de 3,403 en un modelo de Cox ajustado por edad e hipoalbuminemia.

El selenio plasmático tiene correlación positiva con los tres marcadores nutricionales estudiados en el grupo de pacientes en diálisis: creatinina, albúmina y colesterol, correlación que no se da en población sana.

El selenio plasmático se comporta como un predictor de riesgo de mortalidad independiente de otros marcadores bioquímicos habituales en el control de estos pacientes.

Los pacientes en tratamiento crónico con estatinas tienen un selenio plasmático significativamente superior al resto de pacientes (65,2 vs. 57,0 µg/L, $p = 0,010$).

2 Abstract

Introduction

Selenium is an essential trace element for mammals, other animals and many bacteria, forming part of numerous enzymes or selenoproteins. These have antioxidant activity, thyroid regulatory functions and roles on the immune system. Selenium is present in the active site of these enzymes in the form of selenocysteine.

The consumption of selenium in the diet varies widely between different geographical locations due to the different availability of this element in soils. The absorption of selenium from the diet is not regulated and has a high bioavailability (> 50%).

Selenium toxicity is rare and occurs when there is excessive intake in the diet, either naturally in seleniferous areas or by the intake of supplements with high doses. Deficiency of this element can occur as a consequence of some diseases, some therapies or a chronic deficient intake. The kidneys play an important role in selenium homeostasis and they accumulate the largest amount of this element. Glutathione peroxidase plasma isoform is synthesized mainly in renal tubular proximal cells.

Several authors have found low glutathione peroxidase activity and low selenium in blood components of patients with chronic kidney disease (CKD). Among the mechanisms proposed to explain these alterations are a decreased intake, urinary or dialytic losses, impaired intestinal absorption, abnormal binding to proteins or pharmacological therapies.

Protein-energy wasting (PEW) and chronic inflammation in renal patients are associated with refractory anaemia, disruption in bone and mineral metabolism and an increase in mortality.

At present, there is insufficient evidence to recommend the supplementation of vitamins and trace elements in patients with CKD or end-stage renal disease (ESRD). The latest guideline from the European Renal Best Practice states that selenium supplements should not be used, unless there is clinical evidence of deficiency, in which case it should be monitored closely.

Serum albumin, creatinine, prealbumin and cholesterol are biochemical markers usually monitored in CKD to assess the nutritional status. C-reactive protein (CRP) is an inflammation marker that accurately predicts mortality in ESRD, and hemoglobin is the most used marker of anaemia. To date, sufficient evidence has not been accumulated to establish the utility of serum or plasma selenium as a biomarker in CKD.

Objectives

The main objective of this doctoral thesis is the study of the utility of serum or plasma selenium as a biomarker in CKD and ESRD patients receiving dialysis. To reach this goal, a method for selenium determination was developed and subsequently validated and the selenium reference range for adults in the area was established. A 5-year survival analysis was carried out, possible associations between selenium and other biomarkers were studied and selenium levels were compared between groups of patients according to chronic statin treatment.

Material and methods

A retrospective cross-sectional observational study was carried out that included 102 plasmas or sera from CKD patients stages 4 and 5, and 118 from control subjects. Selenium and several biochemical nutrition and inflammation markers were measured. Demographic, epidemiological and mortality data were collected.

A VARIAN electrothermal atomic absorption spectrophotometer (ETAAS) was used to develop and validate a selenium determination method, used in a preliminary study of selenium in patients on peritoneal dialysis.

A Perkin-Elmer ETAAS spectrophotometer was used to optimize a selenium determination method that was used in the retrospective observational study.

Selenium reference interval was estimated by the percentiles nonparametric method. The need for separate reference ranges according to sex or age was studied using z test and Student's t test.

Comparisons were made by Mann-Whitney, ANOVA and chi-square tests. Correlations were estimated using Spearman's Rho. Kaplan-Meier method was used to estimate survivals and Cox multivariate regression for the calculation of Hazard Ratios (HR). The association between selenium and chronic use of statins was analysed by logistic regression.

Ethics approval was obtained from the Ethics Committee of the Hospital Universitario Severo Ochoa.

Results

The selenium method developed in a VARIAN spectrophotometer had intermediate imprecisions of 5.8% and 4.7% and bias of 1% and -0.9%.

The selenium method optimized in a Perkin-Elmer spectrophotometer had an intermediate imprecision of 4.4% and a bias of 0.09%.

The serum or plasma selenium reference interval for adults in the area was 63 – 118 µg/L. The possibility that separate reference intervals were needed was ruled out ($z_{\text{sex}} = 1.92$ and $z_{\text{age}} = 0.36$, less than $z^* = 2.10$).

The median selenium was 61.6 µg/L in the cohort of patients and 89.3 µg/L in the control group. The difference was statistically significant ($p < 0.001$). 52% of patients had hyposelenemia.

The median follow-up of the patients was 72 months. At the end of the study, 48.5% of the patients had died. The mean survival was 46.2 months for patients with hyposelenemia (95% CI 39.2 - 53.3 months) and 61.8 months for the rest (95% CI 55.6 - 68.0 months). The difference was statistically significant ($p = 0.000$). The HR for mortality of the low selenium group versus the rest of the patients was 2.585 (95% CI 1.324 – 5.048), according to a Cox model adjusted for age, renal replacement therapy and history of ischemic heart disease.

In the subcohort of patients undergoing dialysis (85 patients), the mean survival was 45.4 months with hyposelenemia (95% CI 38.0 - 52.8 months) and 59.8 months for the rest (95% CI 51.9 - 67.8 months). The difference was statistically significant ($p = 0.000$). At the end of the study, 67.3% of patients with hyposelenemia and 25% of patients with normo or hyperselenemia had died. The HR for mortality of the low selenium group was $HR = 2.952$ (95% CI 1.402 - 6.217).

Patients on chronic treatment with statins had a median selenium of 65.2 $\mu\text{g/L}$, (interquartile range (IQR) = 55.8 - 77.5 $\mu\text{g/L}$), significantly higher ($p = 0.010$) than the selenium of patients who were not in treatment (57.0 $\mu\text{g/L}$, IQR = 46.3 - 68.8 $\mu\text{g/L}$).

Selenium was correlated with albumin ($Rho = 0.440$), cholesterol ($Rho = 0.278$) and creatinine ($Rho = 0.367$) in the subcohort of patients on dialysis, while there was no significant correlation in the control group. Classification based on low selenium led to two groups with significant difference in time on dialysis ($p = 0.018$), albumin ($p = 0.003$), creatinine ($p = 0.004$), cholesterol ($p = 0.038$) and phosphate ($p = 0.025$). HR of mortality with hyposelenemia was 3.403 (95% CI 1.592 - 7.275) according to a model adjusted for age and low serum albumin ($< 3.8 \text{ mg/dL}$).

Conclusions

A plasma and serum selenium determination method was developed in a VARIAN spectrophotometer with adequate accuracy and precision. A selenium method was optimized in a Perkin-Elmer spectrophotometer with adequate accuracy and precision.

The reference interval of serum and plasma selenium for the adult population of the Leganés area is 63 - 118 $\mu\text{g/L}$. Separate reference intervals are not necessary, neither by sex nor by age.

Plasma selenium of patients with advanced CKD is significantly lower than selenium of the control subjects. 52.0% of patients have low selenium. In the subcohort of dialysis patients, this percentage is 57.6%.

The average survival of the group of patients with hyposelenemia is significantly lower than that of the group with normo or hyperselenemia, both in the global cohort and in the subcohort on dialysis.

Hyposelenemia has a mortality HR of 2.585, according to a Cox model that includes the covariates age, replacement therapy and history of ischemic heart disease. In the subcohort on dialysis, hyposelenemia has a mortality HR of 2.952, according to a Cox model that includes the covariates age, dialysis modality and history of cardiovascular disease. The mortality HR is 3.403 in a Cox model adjusted for age and hypoalbuminemia.

Plasma selenium has a positive correlation with the three nutritional markers studied in the group of patients on dialysis: creatinine, albumin and cholesterol, a correlation that does not exist in healthy population.

Plasma selenium behaves as a predictor of mortality risk independent of other common biochemical markers used to monitor these patients.

Patients on chronic treatment with statins have higher plasma selenium levels than the rest of patients (65.2 vs. 57.0 $\mu\text{g/L}$, $p = 0.010$).

3.INTRODUCCIÓN

3 Introducción

El selenio es el elemento químico de número atómico 34, perteneciente al grupo 16 de la tabla periódica o grupo de los calcógenos, junto con oxígeno, azufre, telurio y polonio.

Fue descubierto en 1817 por el químico sueco Jöns Jacob Berzelius cuando estudió la composición de un precipitado rojo depositado en las cámaras de plomo empleadas en la producción de ácido sulfúrico. Tras descartar que se tratara de un precipitado de telurio, llegó a la conclusión de que estaba frente a un nuevo elemento al que nombró selenio en honor a la luna.

Es un no metal, con características químicas similares a sus compañeros de grupo azufre y telurio. El selenio es el primer elemento del grupo que presenta cierto carácter metálico. Existe en varias formas alotrópicas, es semiconductor y fotoconductor.

Es un elemento traza esencial para mamíferos, otros animales y muchas bacterias, formando parte de enzimas o selenoproteínas. Estas proteínas contienen el aminoácido selenocisteína (Sec, U), conocido como el aminoácido 21.

Los riñones tienen un papel importante en la homeostasis del selenio. La mayoría de los datos publicados coinciden en que los niveles séricos de selenio están significativamente disminuidos en pacientes con enfermedad renal crónica avanzada comparados con los niveles de grupos control.

Tras conocerse la naturaleza esencial del selenio y comenzar a describirse las funciones de las selenoproteínas, se descubren muchas relaciones entre el estado funcional del selenio y la función inmunitaria, reproductiva, cognitiva, el riesgo de padecer distintas enfermedades o la mortalidad global. ¿Es el selenio un predictor especial en enfermedad renal?

3.1 Selenio: bioinorgánica y bioquímica

3.1.1 Del suelo a las proteínas

Selenio en suelos

El selenio es transferido de manera eficiente entre los distintos eslabones de la cadena alimenticia: suelo, plantas, animales y humanos. La fuente primaria es el suelo y su extracción por parte de cultivos y flora es fortuita, ya que no es un nutriente esencial para plantas superiores (1). La disponibilidad de selenio en los suelos varía ampliamente entre áreas. Se asocian mayores concentraciones de selenio con algunas rocas fosfáticas, lutitas bituminosas, carbones y minerales sulfurados. El resto de rocas suelen contener bajas concentraciones y las regiones pobres en selenio son más abundantes que las seleníferas (2). La biodisponibilidad del selenio para las plantas depende, además de su concentración en el suelo, de factores como el pH y las condiciones redox; la forma química del selenio; la textura, compactación y temperatura del suelo; la cantidad de materia orgánica; la presencia de iones competitivos y la actividad microbiana (2).

Las especies inorgánicas de selenio predominantes en la mayoría de las condiciones son selenito (Se^{4+}) y selenato (Se^{6+}), siendo aquélla la más estable. El selenito es adsorbido por partículas del suelo con más afinidad que el selenato, y esta adsorción es mayor cuanto menor es el pH. El selenato, que es más prevalente en suelos neutros y alcalinos, es más soluble y móvil, y es la especie inorgánica más biodisponible. Selenio (Se^0) y seleniuro (Se^{2-}) pueden encontrarse en medios reductores, ácidos y ricos en materia orgánica. Son poco solubles y tienen muy baja disponibilidad para plantas y animales, aunque ciertas bacterias pueden actuar sobre esas especies.

La incorporación de selenio a las plantas también depende de la presencia de iones que compiten por la fijación en plantas o en suelos, como sulfatos y fosfatos. El sulfato inhibe la toma de selenio por la planta, mientras que el fosfato aumenta su absorción porque desplaza al selenito de ser adsorbido por partículas del suelo.

Tabla 3-1. Concentraciones de selenio en suelos de distintas regiones

País	Se en suelo (mg/Kg)	Ingesta de Se ($\mu\text{g}/\text{día}$)	Se Suero ($\mu\text{g}/\text{L}$)
Bélgica	0,11	28 – 61	73 – 110

Brasil	Sin datos	60	Sin datos
China (Enshi)	10 – 40	3200 – 6690	1300 – 7500
China (Keshan)	0,17	3 – 11	23,9
Finlandia	0,15 – 0,72	125	77 – 134
Francia	0,18	47	84,7
Alemania	6,6	47	63 – 106
Italia	Sin datos	49	76 – 94
Japón	0,7 – 1,0	133	Sin datos
España	0,07 – 0,39	60	74 – 84
Suecia	0,39	38	105
Suiza	Sin datos	70	96 – 113
Turquía	0,03	30	58 – 113
Países Bajos	Sin datos	67	93,6
Reino Unido	0,18 – 29,70	41	60 – 81
EEUU	0,11 – 18,36	98	95 – 320

Modificado de Dumont et al (2006) (3).

Incorporación de selenio en especies vegetales

Las distintas especies vegetales difieren en su habilidad para asimilar y acumular selenio. Se pueden clasificar en tres grupos: acumuladoras, acumuladoras secundarias y no acumuladoras de selenio. La incorporación de selenio en la raíz depende de un transportador de sulfato y su mayor preferencia por selenato o sulfato varía según la especie (3,4). Mientras que no acumuladoras rara vez presentan concentraciones mayores de 100 µg/g peso seco, las acumuladoras que crecen en un ambiente rico en selenio pueden contener hasta 40000 µg/g peso seco.

La planta acumuladora más característica es *Bertholletia excelsa*, productora de las nueces de Brasil. Especies de los géneros *Brassica* (brócoli, repollo) y *Allium* (ajo, cebolla) son acumuladoras secundarias. Cereales como trigo, avena, centeno y cebada son no acumuladores.

Tabla 3-2. Concentraciones de selenio en alimentos vegetales.

Alimento	Condiciones de crecimiento	Concentración típica
Trigo, maíz, avena, centeno	Dakota del Norte, Dakota del Sur, Nebraska, Kansas, Colorado	≤ 30 µg/g
	Otras regiones de EEUU	0,1 µg/g
Harina de trigo	EEUU	0,44 µg/g
Maíz	Suelo selenífero	8,7 µg/g
	Área ↑Se China	18 µg/g
Cebada	Dinamarca	≤ 0,11 µg/g
Arroz	Suelo selenífero	4,0 µg/g
	Área ↑Se China	3,6 µg/g
Nueces de Brasil	Natural	2,54 µg/g
Nuez	Negra y blanca	0,38 µg/g
Anacardos	Natural	0,27 µg/g
Espárragos	Suelo selenífero	11 µg/g
Brócoli	Enriquecido	62,3 µg/g
Col	Enriquecido	94 µg/g
Champiñón	Enriquecido	69 µg/g
Cebolla	Natural	< 0,5 µg/g
	Suelo selenífero	17 µg/g
Ajo	Natural	< 0,5 µg/g
	Enriquecido	1355 µg/g

Modificado de Rayman et al (2008) (5)

Metabolismo en plantas

La ruta metabólica predominante difiere entre acumuladoras y no acumuladoras, pero también entre especies.

El selenato absorbido es reducido a selenito, y éste es reducido a seleniuro con la participación de glutatión reducido. En un proceso similar al metabolismo del azufre, se transforma el seleniuro en selenocisteína (Sec), que puede ser metabolizada a

selenometionina (Se-Met). Sec y Se-Met pueden incorporarse a proteínas de manera no específica en lugar de Cys y Met.

Incorporación de selenio en animales

Aunque los vegetales son la mayor fuente de selenio en la dieta, los animales constituyen una fuente fiable para humanos y otros omnívoros ya que el selenio es un oligoelemento esencial para ellos.

Solo las plantas pueden sintetizar selenometionina, pero los animales pueden incorporar este aminoácido de manera inespecífica a las distintas proteínas. Sintetizan selenocisteína que incorporan específicamente a las selenoproteínas. Así, los animales contienen tanto Se-Met en la mayoría de las proteínas como Sec en las selenoproteínas.

Incorporación de selenio en humanos

La absorción de selenio a nivel intestinal no está regulada por homeostasis. El estado nutricional tampoco parece afectar al grado de absorción (5). Se absorbe más del 50% del selenio ingerido. La absorción de Se-Met es activa y usa el mismo transportador que la metionina. Se desconoce el mecanismo de absorción de Sec y el selenio inorgánico se absorbe por difusión en el duodeno.

Las especies orgánicas de selenio tienen mayor biodisponibilidad que las inorgánicas, elevando el selenio sanguíneo de manera más efectiva, aunque todas producen un aumento en la actividad de glutatión peroxidasa. La diferencia radica en que la Se-Met se puede incorporar en lugar de la metionina en proteínas del músculo esquelético, de eritrocitos o en la albúmina plasmática. De esta manera, se produce un almacenamiento de selenio, aunque solo se dispone de él con el recambio de estas proteínas.

Un estudio de la dieta norteamericana reveló que 5 alimentos aportaban el 50% del selenio (ternera, pan blanco, cerdo, pollo y huevos) y que un grupo de sólo 22 alimentos proporcionaba el 80% del selenio de la dieta (6).

Metabolismo en humanos y otros mamíferos

La Se-Met obtenida del catabolismo de proteínas se convierte en Sec por la vía de la trans-selenación (5). La Sec así obtenida más la de la dieta se convierte en H₂Se con la intervención de la enzima Sec β-liasa. La Se-Met también puede dar lugar a CH₃SeH. El selenito y el selenato absorbidos se utilizan en la síntesis de proteínas, previa reducción a H₂Se, con la mediación de glutatión. El H₂Se juega un papel central en el metabolismo del selenio.

El H_2Se se utiliza en la producción de monoselenofosfato HSePO_3^{2-} , catalizado por la selenoproteína SPS2 (selenofosfato sintetasa 2). El monoselenofosfato es el donante de selenio en la conversión de ser-tRNA en Sec-tRNA (7).

El exceso de selenio se elimina mediante la producción de metabolitos metilados que se excretan por vía urinaria. El H_2Se se metila y conjuga para dar 1 β -metilseleno-N-acetil-D-galactosamina, y el CH_3SeH se metila para producir ión trimetilselenomio $(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$.

El exceso de H_2Se también puede llevar a la producción de superóxido y otras especies reactivas de oxígeno, lo que se asocia con la toxicidad del selenio.

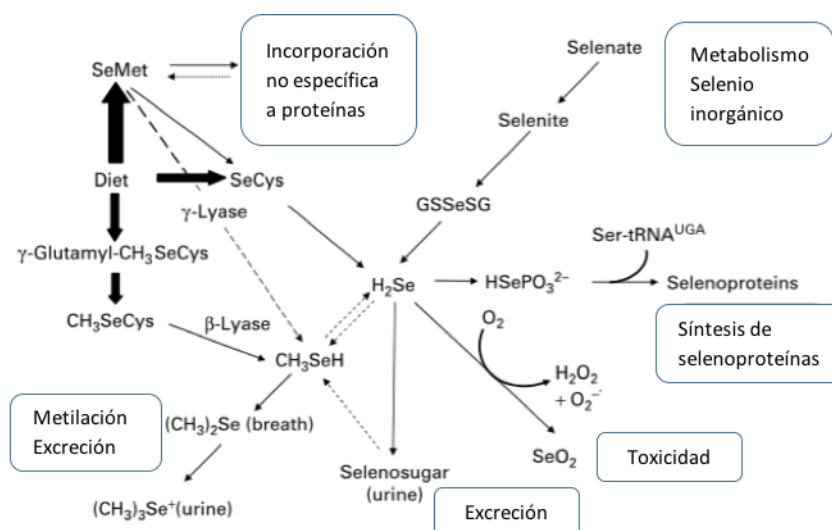


Figura 3-1 Metabolismo del selenio en humanos. Modificado de Rayman *et al* (2008) (5).

3.1.2 Selenoproteínas

Las selenoproteínas son el grupo de proteínas que contienen selenocisteína (Sec) como parte integral de la cadena polipeptídica. Están presentes en los tres dominios de los seres vivos: arqueas, bacterias y eucariotas, pero no en todas las especies de estos dominios. Las levaduras y las plantas superiores no tienen ni selenoproteínas ni los componentes de la maquinaria de síntesis de las selenoproteínas y en su lugar expresan homólogos de cisteína (8).

Síntesis de selenoproteínas

La característica especial de la traducción de selenoproteínas radica en la recodificación del codón de parada UGA, localizado en la región codificante del RNA mensajero, a señal de inserción del aminoácido selenocisteína. En condiciones normales, la maquinaria de traducción lee el codón UGA como señal de parada y libera la cadena polipeptídica naciente del ribosoma. Sin embargo, en la traducción de selenoproteínas, una serie de factores redirigen a la inserción de Sec. Estos factores están siendo caracterizados en los últimos años y los principales son el codón UGA, el elemento SECIS (elemento de inserción de selenocisteína), el tRNA^{[Ser]Sec}, la fosfoseril-tRNA^{[Ser]Sec} quinasa y varios factores proteicos (9).

La terminación de la traducción está codificada por los codones UGA, UAA y UAG. En las mitocondrias, UGA codifica la inserción de triptófano y, en el genoma nuclear, puede codificar la introducción de selenocisteína. El ácido ribonucleico tRNA^{[Ser]Sec} tiene el anticodón de UGA y controla la expresión de todas las selenoproteínas, característica que no tiene ningún otro tRNA (10). La selenocisteína se sintetiza en su propio tRNA usando serina como intermediario. Participa la enzima SPS2, que es una selenoproteína en la mayoría de organismos con selenoproteoma (en algunos es un análogo que contiene cisteína), que produce monoselenofosfato. La enzima fosfoseril-tRNA^{[Ser]Sec} quinasa fosforila la seril-tRNA, que sirve como sustrato para la Sec sintasa en la producción de tRNA^{[Ser]Sec}.

El elemento SECIS es una estructura secundaria del RNA en tallo-bucle. Está localizado en la región 3' del mRNA, entre varios cientos y varios miles de pares de bases más allá del codón UGA. Un único elemento SECIS es suficiente para ordenar la incorporación de Sec en todas las selenoproteínas, excepto en la selenoproteína P, cuyo mRNA contiene dos elementos SECIS que dictan la decodificación de diez codones

UGA-Sec en mamíferos. El mecanismo se complica ya que la selenoproteína P existe en cuatro isoformas, que surgen de la finalización de la traducción en el segundo, tercero o séptimo codón UGA, dependiendo de los niveles de selenio (10). Se desconoce todavía cómo la maquinaria de traducción se dirige a la terminación o a la inserción de Sec en estos codones.

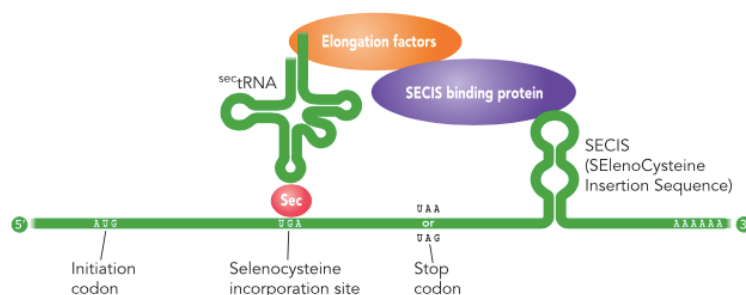


Figura 3-2. Elementos requeridos para la incorporación de selenocisteína. Extraído de Moghadaszadeh *et al* (2006) (11).

El selenio es un regulador clave de su incorporación a las selenoproteínas. Se ha demostrado que existe una jerarquía en la expresión de selenoproteínas durante la escasez y la repleción de selenio. Algunos órganos y tejidos son más eficientes que otros en el mantenimiento de los niveles de selenio y en la producción de ciertas selenoproteínas durante la insuficiencia de selenio, como consecuencia de las distintas funciones biológicas de las selenoproteínas en los diferentes tejidos. El selenio actúa a varios niveles como la estabilidad del mRNA, regulando la eficiencia en la traducción del codón UGA-Sec y ajustando los niveles de tRNA^{[Ser]Sec} (10).

Selenoproteínas humanas

Se conocen 25 selenoproteínas en humanos. Entre sus funciones están las actividades antioxidante y antiinflamatoria y la producción de hormonas tiroideas. En condiciones de escasez de selenio, se prioriza la síntesis de algunas selenoproteínas en detrimento de otras. Son enzimas importantes para la salud y para la vida, como demuestran estudios en ratones *Knockout* o el efecto de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en sus genes en el riesgo de enfermedad y mortalidad (12).

Las últimas siete selenoproteínas conocidas se identificaron mediante un método bioinformático que aprovecha la posibilidad de detectar potenciales elementos SECIS y

su copresencia con codones UGA en marco de lectura. Con este método también se detectaron las otras 18 selenoproteínas conocidas hasta entonces (13).

Las tres familias mejor caracterizadas de selenoproteínas son las tiorredoxina reductasas (TrxR), las glutatión peroxidasas (GPx) y las yodotironina desyodasas (DIO).

Glutatión peroxidasas

GPx1-4 y GPx6 son selenoproteínas en humanos. Catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos con glutatión (GSH) como dador de electrones. Las cinco isoenzimas varían en su localización y su especificidad de sustrato. GPx1 es citosólica y ubicua, GPx2 es específica del tracto gastrointestinal, GPx3 es plasmática, GPx4 es ubicua y GPx6 parece ser específica de tejido embrionario y epitelio olfativo. GPx1-3 reducen H_2O_2 e hidroperóxidos orgánicos y GPx4 reduce hidroperóxidos de fosfolípidos y colesterol (7,9). GPx3 se sintetiza principalmente en los riñones, pero también en corazón y tiroides.

GPx1 es una de las más sensibles a cambios en los niveles de selenio, con disminución pronunciada de mRNA en caso de escasez. GPx2 y 4 son mucho más resistentes a la carencia de selenio.

La actividad reductora de peróxidos lipídicos de GPx4 es crítica. Los ratones Knockout para esta enzima mueren durante el periodo embrionario.

Tiorredoxina reductasas

Esta familia de selenoproteínas cataliza la reducción de tiorredoxina oxidada usando NADPH. Muchas enzimas con actividad redox utilizan la tiorredoxina como cofactor en reacciones ditiol-disulfuro que son las que mayoritariamente mantienen el ambiente reducido de las células. TrxR1 es citosólica, TrxR2 actúa en mitocondrias y TrxR3 es específica del testículo y actúa también reduciendo el glutatión oxidado.

TrxR2 tiene mayor resistencia a la insuficiencia de selenio que TrxR1. Los ratones Knockout para ambas enzimas mueren también durante su gestación (9).

Yodotironina desyodasas

Las tres desyodasas (DIO) son proteínas de membrana que catalizan reacciones de desyodación que activan e inactivan las hormonas tiroideas tiroxina, triyodotironina y triyodotironina inversa (T_4 , T_3 y rT_3 , respectivamente). El papel principal de DIO1 parece

ser la producción de T₃ en tiroides y el control de sus niveles circulantes, mientras que DIO2 y DIO3 regulan los niveles hormonales a nivel de órgano y tejido. Las desyodasas tienen alto rango en la jerarquía de suministro de selenio en insuficiencia de este oligoelemento (10).

Selenoproteína P

La selenoproteína P (SelP) es la segunda selenoproteína más abundante en plasma y contiene el 50% del selenio plasmático. Se expresa en todos los tejidos y difiere del resto de selenoproteínas en que incorpora 10 Sec por molécula. Se considera su función principal el transporte de selenio a los distintos tejidos, como confirman los estudios que han empleado ratones Knockout para esta proteína. Estos ratones no muestran ninguna disrupción en la producción y circulación de hormonas tiroideas, lo que sugiere que la tiroides no necesita a la SelP para el suministro de selenio. SelP también tiene funciones de quelante de metales pesados y actividad antioxidante (10).

Tabla 3-3. Resumen de selenoproteínas humanas

Selenoproteína	Abreviatura	Función y significado
Glutación peroxidasa citosólica	GPX1	Knockout más susceptible a estrés oxidativo. Sobreexpresión incrementa el riesgo de diabetes.
Glutación peroxidasa gastrointestinal	GPX2	Ratones Knockout doble GPX1/GPX2 desarrollan cáncer intestinal.
Glutación peroxidasa plasmática	GPX3	Antioxidante en tiroides, protección cardiovascular.
Glutación peroxidasa hidróperóxido fosfolipídico	GPX4	Deleción del gen es letal, antioxidante crucial.
Glutación peroxidasa olfativa	GPX6	Importancia desconocida.
Tiorredoxina reductasa tipo I	TXNRD1, TrxR1, TR1	Citoplasma y núcleo. Deleción del gen es letal.
Tiorredoxina reductasa tipo II	TXNRD2, TrxR2, TR3	Mitocondria. Deleción del gen es letal.

Tiorredoxina reductasa tipo III	TXNRD3, TrxR3, TR2, TGR	Expresión específica del testículo.
Desyodasa tipo I	D1, DIO1	Niveles de hormonas tiroideas sistémicas.
Desyodasa tipo II	D2, DIO2	Niveles de hormonas tiroideas locales.
Desyodasa tipo III	D3, DIO3	Inactiva hormonas tiroideas.
Selenoproteína H	SELH	Nuclear. Participa en transcripción.
Selenoproteína I	Seli, hEPT1	Posiblemente participa en síntesis de fosfolípidos.
Selenoproteína K	SELK	Transmembrana. Flujo de calcio en células inmunitarias.
Selenoproteína M, Selenoproteína 15	SELM, SEP15	Tiol-disulfuro oxidorreductasa. Posiblemente participa en plegamiento proteico.
Selenoproteína N	SELN, SEPN1, SepN	Papel potencial en formación temprana de músculo.
Selenoproteína O	SELO	Posible función redox. Importancia desconocida.
Selenoproteína P	SELP, SEPP	Transporte de selenio a cerebro y testículos. Knockout: problemas neurológicos y esterilidad masculina. Antioxidante intracelular en fagocitos.
Selenoproteína R	SELR, MsrB1	Metionina sulfóxido reductasa.
Selenoproteína S	SELS, SEPS1, SELENOS, VIMP	Transmembrana en membrana plasmática y retículo endoplásmico.
Selenoproteína T	SELT	Movilización de calcio en el retículo endoplásmico.
Selenoproteína V	SELV	Expresión específica del testículo.
Selenoproteína W	SELW	Papel antioxidante, quizá importante en el crecimiento muscular.
Selenofosfato sintetasa	SPS2	Participación en la síntesis de selenoproteínas.

Extraído de Huang et al (2012) (14).

3.1.3 El selenio como elemento esencial

Déficit de selenio

El **déficit moderado** de selenio se ha asociado con riesgo incrementado de ciertos tipos de cáncer y de infección, infertilidad masculina, disminución de la función inmunitaria y tiroidea y varias condiciones neurológicas, incluyendo las enfermedades de Parkinson y Alzheimer (10). En algunos de estos casos, la evidencia es escasa o carente de consenso.

El **déficit severo** se asocia con la *enfermedad de Keshan*, una cardiomiopatía dilatada que afecta principalmente a niños y mujeres en edad fértil, potencialmente mortal, endémica de varias regiones de China con concentraciones de selenio en suelo extremadamente bajas. Se cree que la infección con el virus Coxsackie B desencadena la enfermedad, que se puede prevenir o revertir con la administración de suplementos (4). Una cepa de este virus (CVB3/0), normalmente benigna, se vuelve virulenta en ratones tanto con déficit de selenio como con déficit de vitamina E (2). La enfermedad de Keshan fue prevalente en áreas cuyos cultivos contenían menos de 0,04 mg Se/Kg, con ingestas diarias de selenio entre 10 y 15 µg.

La *enfermedad de Kashin-Beck*, que es una osteoartropatía de zonas rurales de China, Tíbet y Siberia, también se ha asociado con carencia severa de selenio, pero otros factores como el déficit de yodo parecen ser más importantes en su desarrollo.

Se han publicado casos de cardiomiopatía en pacientes recibiendo nutrición parenteral con un aporte insuficiente de selenio (5).

Toxicidad de selenio

La toxicidad del selenio depende de la especie química, la concentración y la coexistencia de otros factores. Niveles bajos de vitamina E aumentan la toxicidad del selenio. El metilmercurio intensifica la deficiencia de selenio, pero el mercurio inorgánico aumenta la toxicidad del selenio metilado. Ingestas elevadas de selenio provocan la acumulación de cobre en corazón o hígado pero protegen frente a cadmio y mercurio (2).

Los signos de selenosis son pérdida de cabello, uñas engrosadas, quebradizas y estratificadas, aliento a ajo y fragilidad de la piel. Se ha encontrado exposición crónica a altos niveles de selenio en poblaciones de áreas seleníferas como el norte de las grandes praderas de EEUU, zonas de Venezuela y Colombia y la región de Enshi en China (4).

En esta última región, se asoció la selenosis con el consumo de cultivos con alto contenido en selenio, sembrados en suelos con más de 300 µg Se/g. Este brote de selenosis se debió a una sequía que causó el malogro de la cosecha de arroz, lo que obligó a comer más verduras de alto contenido en selenio. Durante los años de mayor prevalencia (1961 – 1964), los índices de morbilidad alcanzaron el 50% en las poblaciones más afectadas, formadas por granjeros de subsistencia en áreas remotas. Los síntomas más comunes fueron pérdida de cabello y uñas, pero también se dieron trastornos del sistema nervioso, parálisis, problemas de piel y dentadura. Estudios posteriores demostraron ingestas diarias de selenio de 3200 a 6800 µg (2).

A partir de los estudios realizados sobre la población de Enshi, se establece el nivel mínimo de efecto adverso observable (LOAEL) en 1540 µg/día y el nivel sin efecto adverso observable (NOAEL) en 819 µg/día. La OMS considera 400 µg/día el límite alto de ingesta tolerada en adultos (4).

Requerimientos nutricionales

Los estudios realizados en China sobre población de áreas con enfermedad de Keshan y población de áreas seleníferas permitieron establecer en 19 y 13 µg Se/día la ingesta mínima que evita el desarrollo de la enfermedad de Keshan en hombres y mujeres respectivamente (15).

Un criterio para evaluar la necesidad fisiológica de selenio es estudiar la mínima ingesta necesaria para maximizar la actividad de una enzima o grupo de enzimas. El más utilizado es el de las glutatión peroxidasas (GPx). A partir de los datos obtenidos en ensayos clínicos en China y Nueva Zelanda, se establecieron distintas recomendaciones de ingesta diaria por parte de organismos nacionales e internacionales, como *Standing Committee on the Evaluation of Dietary Reference Intakes* de EEUU y Canadá, *Department of Health* de Reino Unido o *Scientific Committee for Food* de la Comunidad Europea. Las recomendaciones varían según el modo de efectuar el cálculo y se encuentran entre 55 y 70 µg/día para adultos (16). Por su parte, la OMS publicó en 1996 valores de referencia para el selenio intentando que fueran recomendaciones aplicables a nivel mundial. Concluyeron que alcanzar 2/3 de la actividad máxima de las GPx era suficiente para ofrecer protección contra el estrés oxidativo, y que esta actividad se obtenía con una ingesta mínima para hombres y mujeres de 40 y 30 µg/día

respectivamente (1). En la última revisión de 2004, la OMS establece una ingesta mínima recomendada de 34 y 26 µg/día (hombres / mujeres), significativamente inferior a la recomendada por otros organismos (17).

Tabla 3-4. Valores de ingesta diaria recomendada de selenio en adultos por diferentes países y organismos

País	Ingesta diaria recomendada (µg Se día ⁻¹)						
	EEUU	Reino Unido	Comunidad Europea	OMS	EEUU	OMS	Australia y Nueva Zelanda
Año	1989	1991	1993	1996	2000	2004	2005
Hombre	70	75	55	40	55	34	70
Mujer	55	60	55	30	55	26	60

Extraído de López-Bellido *et al* (2013)(1).

Tabla 3-5. Ingesta mínima recomendada de selenio por rango de edad, OMS 2004

Grupo		Edad	µg Se día ⁻¹
Bebés		0 - 6 meses	6
		7 - 12 meses	10
Niños		1 - 3 años	17
		4 - 6 años	22
		7 - 9 años	21
Adolescentes	Mujeres	12 - 18 años	26
	Hombres	12 - 18 años	32
Adultos	Mujeres	19 - 65 años	26
		65+ años	25
	Hombres	19 - 65 años	34
		65+ años	33
Embarazo		2º trimestre	28
		3º trimestre	30

Mujeres lactantes	0 - 6 meses postparto	35
	7 - 12 meses postparto	42

Extraído de WHO/FAO (2004) (17).

Según expone Lopez-Bellido *et al* (1), muchos expertos coinciden en que la completa saturación de la actividad de GPx sería el nivel adecuado y que el peso corporal por individuo usado como base de cálculo para las necesidades de selenio, 65 kg para hombres, está muy por debajo de la media de la mayoría de los países desarrollados.

El consumo diario de selenio a nivel global es muy variado. Hay regiones donde el consumo está o ha estado en rango tóxico como las áreas de selenosis de China (5000 µg/día). Se consume en rango alto en Venezuela y noroeste de EEUU (200 – 724 µg/día), en rango adecuado – alto en el resto de América del Norte y Japón (100 – 200 µg/día), rango adecuado – escaso en Australia, Europa occidental y Nueva Zelanda (30 – 90 µg/día) y bajo o deficiente en Europa oriental y el cinturón de Keshan en China (7 – 30 µg/día) (4).

Corrigiendo la carencia de selenio

Durante décadas se han desarrollado métodos para aumentar la cantidad de selenio en el medio y su toma por parte de cultivos y animales en áreas selenodeficientes. Un enfoque consiste en sustituir unos cultivos por otros que sean capaces de acumular más selenio (2). Otro enfoque es fortificar los suelos con fertilizantes enriquecidos con compuestos solubles de selenio. En Finlandia, Nueva Zelanda, China y partes de Canadá se permite el uso de fertilizantes enriquecidos con selenato sódico. En áreas endémicas de enfermedad de Kashin-Beck, el contenido en selenio del trigo era de 0,009 mg/kg de peso seco, y la ingesta diaria de selenio era de 12 µg. La pulverización foliar de selenito aumentó el contenido de selenio en el trigo a 0,081 mg/kg de peso seco y la ingesta diaria a 47 µg.

Finlandia es otro país con baja biodisponibilidad del selenio de sus suelos, debido a su baja concentración, bajo pH y alto contenido en hierro. En 1984 se aprobó un

programa de fortificación de selenio en cultivos mediante pulverización de selenio en fertilizante, que llevó en dos años a multiplicar por tres la ingesta diaria y a aumentar en un 70% el selenio total en suero. La suplementación de fertilizante es segura e incrementa el selenio en animales y humanos de manera efectiva.

3.1.4 Selenio y enfermedad. Evidencia actual

Como recoge M.P. Rayman en su revisión sobre selenio y salud humana de 2012 (12), niveles bajos de selenio se han asociado con mayor riesgo de muerte, de peor función inmunológica y de deterioro cognitivo. Niveles más altos de selenio o la suplementación de este elemento tienen efectos antivirales, sobre la reproducción y reducen el riesgo de enfermedad tiroidea autoinmune. Los estudios prospectivos han encontrado, en general, cierto beneficio en niveles altos de selenio sobre los riesgos de cáncer de próstata, pulmón, colorrectal y de vejiga. Los ensayos clínicos que han estudiado el efecto de la suplementación, sin embargo, llegan a conclusiones discordantes, lo que parece indicar que la suplementación produce beneficios solo si la ingesta era insuficiente. La suplementación en sujetos con niveles ya adecuados de selenio podría aumentar el riesgo de diabetes tipo 2.

Mortalidad

Son varios los estudios prospectivos que han encontrado asociación entre los niveles de selenio y mortalidad por cualquier causa. El estudio EVA (18) (*Étude du Vieillissement Arteriel*) estudió la relación entre selenio y mortalidad en 1389 sujetos de la ciudad francesa de Nantes, de 59 a 71 años de edad, durante 9 años. Encontró una diferencia significativa entre los niveles de selenio plasmático al inicio del estudio entre los participantes que fallecieron ($79,7 \pm 15,8 \mu\text{g/L}$) y los que sobrevivieron ($86,8 \pm 15,8 \mu\text{g/L}$, $p < 10^{-4}$). Los participantes con selenio en los dos cuartiles inferiores tenían un riesgo de mortalidad significativamente mayor que los sujetos del cuartil superior (Q1 vs. Q4: RR = 3,34 (IC 95% 1,71 – 6,53)).

Dentro del estudio NHANES III (19) (*Third Nutrition and Health Examination Survey*), se investigó la asociación entre selenio sérico y mortalidad total y causa-específica en una muestra representativa de la población estadounidense. Con una cohorte de 13887 sujetos de edades comprendidas entre los 20 y los 90 años y un seguimiento de

12 años, se encontró asociación negativa entre el selenio y la mortalidad total. Los sujetos con selenio al inicio del estudio comprendido en los tertiles 2 y 3 tuvieron un riesgo de muerte significativamente menor que los de selenio en el tercil 1 (T2 vs. T1: HR = 0,84 (IC 95% 0,73 – 0,96)). Usando modelos de regresión *spline*, la mortalidad total disminuye con el aumento del selenio sérico hasta 130 µg/L, alcanza una meseta entre 130 y 150 µg/L y aumenta gradualmente a partir de 150 µg/L.

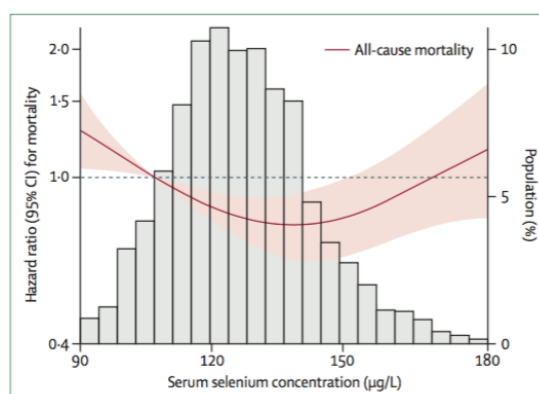


Figura 3-3. Hazards ratio de mortalidad por cualquier causa ajustados por selenio sérico en la cohorte de NHANES III. Extraído de Rayman (2012) (12).

Sin embargo, dentro del estudio *Nutrition Intervention Trial de Linxian, China* (20), se determinó el selenio sérico basal en una sub-cohorte estratificada por sexo y edad de 1103 sujetos. Tras un seguimiento de 15 años, no se encontró asociación entre selenio basal y muerte por cualquier causa, ni en escala continua (RR = 0,96, $p = 0,16$) ni comparando cuartiles (Q4 vs. Q1: RR = 0,93 (IC 95% 0,72 – 1,19)).

Cáncer

En la década de 1960 se sugirió por primera vez que el selenio podía ser anticarcinogénico y desde entonces son muchos los estudios, aunque no todos, que han encontrado una asociación inversa entre los niveles de selenio y el riesgo de cáncer (21).

El riesgo de cáncer de pulmón es inferior en los sujetos expuestos a mayores niveles de selenio (RR=0,74 (IC 95% 0,57 – 0,97)), según un meta-análisis de 16 estudios que valoraron la exposición mediante ingesta informada de selenio, selenio sérico o selenio en uñas, publicado en 2004 (22). Dos estudios posteriores no encontraron, sin embargo, asociación significativa entre niveles de selenio en suero y este tipo de cáncer

(T1 vs. T3: OR = 0,70 (IC 95% 0,37 - 1,33)) (23) e ingesta informada y cáncer de pulmón ($p > 0,05$) (24).

En un meta-análisis de siete estudios epidemiológicos publicado en 2010 (25) se encontró una asociación inversa entre los niveles de selenio en suero o uñas y el riesgo de cáncer de vejiga (mOR = 0,61 (IC 95% 0,42 – 0,87)), asociación mayor en mujeres.

Son muchos los estudios, aunque principalmente pequeños y observacionales, que encuentran asociaciones inversas entre selenio y riesgo de cáncer colorrectal (26). Los resultados sugieren además interacciones con el tabaquismo y el sexo de los sujetos, con asociaciones inversas limitadas a fumadores y hombres.

Con respecto al cáncer de próstata, un meta-análisis de 2005 de 11 estudios de cohortes y 5 estudios de casos y controles encontró un menor riesgo con el aumento de la ingesta de selenio (27). El riesgo relativo agrupado para cualquier ingesta de selenio frente al nivel más bajo de exposición fue de 0,72 (IC 95% 0,61 - 0,84), a partir de los estudios de cohortes y de 0,74 (IC 95% 0,61 - 1,39) según los de casos y controles. Estudios posteriores no han hallado asociación salvo en hombres afroamericanos de la cohorte *US Multiethnic*, con un riesgo relativo significativamente inferior de cáncer de próstata cuando se comparó el tercil superior con el inferior de selenio sérico. Se encuentran mayores asociaciones entre selenio y cáncer de próstata avanzado en lugar de localizado, y las asociaciones mayores se dan en fumadores (26).

Los resultados de ensayos clínicos que estudian el efecto de la suplementación con selenio son también dispares. El ensayo *Nutritional Prevention Cancer Trial* (NPC) sobre 1312 sujetos con historia previa de cáncer de piel no melanoma, a los que se trató con 200 µg diarios de selenio (levadura enriquecida) durante 4 años y medio, no obtuvo efecto sobre la recurrencia del cáncer de piel pero condujo a una reducción significativa de la mortalidad por cáncer (RR = 0,50 (IC 95% 0,31 – 0,80)) y a una disminución en la incidencia de cáncer de cualquier tipo (RR = 0,63 (IC 95% 0,47 – 0,85)), prostático, colorrectal y de pulmón después de un seguimiento de 6,4 años. En análisis posteriores, tras un seguimiento medio total de 7,4 años, solo la reducción significativa en la incidencia de cáncer de cualquier tipo y prostático se mantenía (28). Los sujetos con selenio sérico basal en los dos terciles inferiores experimentaron menor incidencia de cáncer mientras que los del tercil superior (>122 µg/L) tuvieron incremento no significativo en la incidencia de cáncer de todo tipo (HR = 1,20 (IC 95% 0,77 – 1,86)).

Según este estudio, la suplementación no tiene efecto protector e incluso podría ser perjudicial en sujetos con selenio sérico superior a 122 µg/L.

El ensayo *Selenium and Vitamin E Cancer Trial* (SELECT) estudió el efecto de la suplementación con selenio y vitamina E sobre el riesgo de cáncer de próstata en 35533 hombres, con un seguimiento de 5 años y medio. La administración de 200 µg diarios de selenio (selenometionina) no redujo el riesgo de cáncer de próstata localizado (HR = 1,04 (IC 95% 0,83 – 1,30)) (29). Con un selenio sérico basal medio de 136 µg/L, este ensayo no incluyó casi participantes dentro del rango de los que se habían beneficiado de la suplementación en estudios previos como el NPC.

Los resultados discordantes entre estudios y ensayos podrían deberse a varios motivos como que el selenio podría tener mayor efecto contra enfermedad avanzada que localizada; podría afectar al riesgo de cáncer solo sobre un rango concreto de selenio, ni muy bajo ni muy alto; y podría depender de la interacción entre ingesta y genética (12).

Enfermedad cardiovascular

Las selenoproteínas previenen la modificación oxidativa de los lípidos, inhiben la agregación plaquetaria y reducen la inflamación, lo que apoya potenciales beneficios cardiovasculares. Un meta-análisis de 25 estudios observacionales (14 de cohortes y 11 de casos y controles) publicado en 2006 encontró una asociación significativa entre concentración sérica o en uñas de selenio y el riesgo de enfermedad coronaria (categoría superior vs. inferior: RR = 0,85 (IC 95% 0,74 – 0,99) en estudios de cohortes y RR = 0,43 (IC 95% 0,29 – 0,66) en casos y controles) (30). Varios ensayos clínicos de suplementación de selenio no han encontrado efecto protector significativo sobre enfermedad cardiovascular (12). Posteriormente, un ensayo clínico con selenio y coenzima Q10 sobre 443 sujetos ancianos de una población rural sueca encontró una reducción del 50% en la mortalidad cardiovascular, reducción que persistió durante 10 años (HR = 0,51 (IC 95% 0,27 – 0,97)) y que afecta igual a ambos sexos, aunque el tamaño muestral del estudio es pequeño (31).

Función inmunitaria

El suministro de suplementos de selenio tiene efectos estimuladores sobre el sistema inmunológico: mejora la proliferación de células T activadas e incrementa la actividad de las células NK. La diferenciación de las células T en Th1 o Th2 se determina

por señales de las células presentadoras de antígeno o por las citoquinas del medio en condiciones normales de selenio, pero la suplementación sesga la diferenciación hacia fenotipo Th1 y el déficit hacia el fenotipo Th2 (14). La alteración del equilibrio Th1-Th2 hacia Th1 parece beneficiar a la inmunidad antiviral o antitumoral.

Varios ensayos de suplementación en ancianos encontraron incrementos en el recuento de linfocitos T totales o en la citotoxicidad de células NK. Un estudio en adultos en el Reino Unido encontró que la administración de selenio en lugar de placebo se asociaba con una eliminación más rápida del poliovirus vivo atenuado que habían recibido los participantes. Un estudio de casos y controles con pacientes infectados con VIH encontró que los que tenían el selenio sérico inferior a 135 µg/L tenían un riesgo 3 veces superior de desarrollar enfermedad por micobacterias (12).

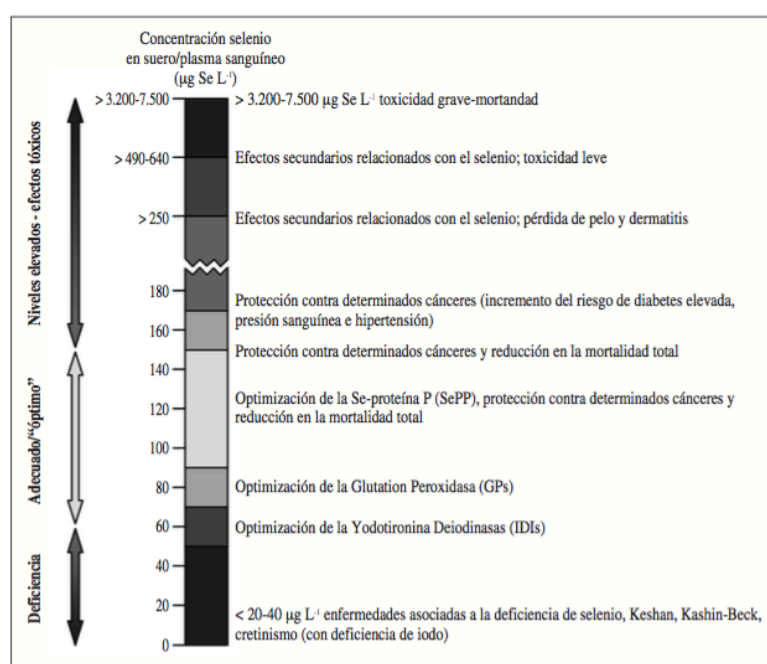


Figura 3-4. Rangos de selenio en sangre y efectos en el metabolismo y la salud. Extraído de López-Bellido *et al* (2013) (1)

3.1.5 Polimorfismos de selenoproteínas y enfermedad

Los polimorfismos pueden tener efectos sobre la expresión génica o sobre la actividad enzimática mediante el cambio de aminoácidos en la proteína o por influencia sobre la regulación de su expresión. En los genes de las selenoproteínas, variantes en

regiones promotoras, 3'UTR o codificantes tienen el potencial de afectar su expresión e influir en el metabolismo del selenio.

Un número creciente de estudios está identificando polimorfismos de un solo nucleótido en genes de selenoproteínas con aparente efecto sobre el riesgo de enfermedad (32). Dada la conocida relación entre selenoproteína S e inflamación, se investiga el efecto de SNPs del gen de SelS sobre enfermedad cardiovascular y pre-eclampsia, y son numerosos los estudios de asociación de polimorfismos del gen de GPx1, el más estudiado el GPx1 Pro198Leu, y varios tipos de cáncer. Otros genes objeto de estudio en este campo son los de GPx4, Sep15, TrxR1 y SelP.

Con respecto al polimorfismo GPx1 Pro198Leu, algunos trabajos, en particular los de cáncer de vejiga, han mostrado un efecto del alelo de GPx1 sobre la actividad enzimática, mientras que otros no. Algunos autores han sugerido que las disparidades entre estudios podrían explicarse si el cambio en la actividad GPx estuviera causado por otro SNP que cosegrega con el polimorfismo estudiado. También es posible que algunas de las discrepancias observadas se relacionen con diferentes estatus de selenio entre las poblaciones estudiadas. El cáncer es una enfermedad multifactorial compleja causada por una combinación de factores y no por un solo polimorfismo.

3.2 Enfermedad renal crónica

La enfermedad renal crónica se define como la presencia, durante al menos 3 meses, de filtrado glomerular estimado (FGe) inferior a 60 ml/min/1,73 m² o de lesión renal. La lesión renal se puede poner de manifiesto directamente a partir de alteraciones histológicas en la biopsia renal o indirectamente por la presencia de albuminuria, alteraciones en el sedimento urinario o a través de técnicas de imagen. Esta definición de ERC, utilizada por todas las guías de práctica clínica, es independiente del diagnóstico clínico. La persistencia de las anomalías es necesaria para distinguir la ERC de la insuficiencia renal aguda (33–36).

3.2.1 Lesión renal

El marcador de lesión renal más utilizado es la albúmina en orina, que refleja el grado de permeabilidad glomerular a las macromoléculas. La albuminuria puede representar una disfunción endotelial generalizada, asociada a hipertensión arterial

(HTA), diabetes, dislipemia, tabaquismo u obesidad. La proteinuria tiene mucha importancia en la patogenia de la progresión de la ERC y la albuminuria es un factor pronóstico renal y de mortalidad independiente del filtrado glomerular y de otros factores de riesgo cardiovascular. Se considera que una persona tiene albuminuria cuando presenta elevación del cociente albúmina/creatinina en orina ($> 30\text{mg/g}$) en al menos 2 de 3 muestras en un periodo de 3 a 6 meses. La presencia significativa en orina de otras proteínas como α_1 -microglobulina o cadenas ligeras o pesadas monoclonales también es indicativo de lesión renal.

La presencia de hematuria o leucocituria en el sedimento urinario durante más de tres meses puede ser indicio de lesión renal, una vez que se ha descartado origen urológico o infección del tracto urinario. Asimismo, los cilindros eritrocitarios o leucocitarios y los hematíes dismórficos son signos de lesión.

La detección por ecografía u otras técnicas de imagen de riñones poliquísticos, hidronefrosis, estenosis de la arteria renal o de riñones pequeños e hiperecogénicos permite probar la existencia de lesión renal.

La biopsia renal puede revelar lesión glomerular, vascular o tubulointersticial (33–36).

3.2.2 Estadiaje

El propósito del estadiaje en ERC es estratificar el riesgo de progresión y complicaciones. Esta estratificación permite elegir los tratamientos no específicos adecuados y la intensidad del seguimiento de los pacientes. Los tratamientos no específicos pueden frenar la progresión y el riesgo de complicaciones. Conocer la causa de la ERC permite tratar a los pacientes con terapia específica dirigida al proceso patológico.

La organización internacional KDIGO (*Kidney Disease Improving Global Outcomes*) clasifica la ERC en seis categorías de riesgo en función del FGe (G1-G5), que se complementan con tres categorías de riesgo según el cociente albúmina/creatinina en orina (A1-A3) (36).

Tabla 3-6. Pronóstico y frecuencia de la monitorización de la ERC por FGe y albuminuria según KDIGO 2012

				Categorías por albuminuria, descripción e intervalo		
				A1	A2	A3
				Normal a aumento leve	Aumento moderado	Aumento grave
				< 30 mg/g	30-300 mg/g	> 300 mg/g
Categorías por FGe, descripción y rango (mL/min/1,73m ²)	G1	Normal o alto	> 90	1 si ERC	1	2
	G2	Levemente disminuido	60-89	1 si ERC	1	2
	G3a	Descenso leve-moderado	45-59	1	2	3
	G3b	Descenso moderado-grave	30-44	2	3	3
	G4	Descenso grave	15-29	3	3	4+
	G5	Fallo renal	< 15	4+	4+	4+

Riesgo de progresión creciente representado por los colores: verde, amarillo, naranja, rojo, rojo oscuro. Los números indican la frecuencia de monitorización anual recomendada. Adaptado de KDIGO (2012) y Martínez-Castelao *et al* (2014) (35,36).

3.2.3 Factores de riesgo

En países desarrollados, la ERC se asocia con envejecimiento, diabetes, hipertensión, obesidad y enfermedad cardiovascular. En los países en desarrollo, se asocia además con infecciones y exposición a fármacos y toxinas (34).

Los factores de riesgo de ERC se clasifican en factores de susceptibilidad; factores iniciadores, que causan directamente el daño renal; factores de progresión, que empeoran el daño y aceleran el deterioro de la función renal; y factores de estadio final, que incrementan la morbilidad y mortalidad. Los principales factores de susceptibilidad son la edad avanzada, historia familiar de ERC, masa renal disminuida, HTA, diabetes, obesidad y nivel socioeconómico bajo. Entre los factores iniciadores destacan las enfermedades autoinmunes, las infecciones urinarias o sistémicas, la litiasis renal, el uso de fármacos nefrotóxicos como los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), la HTA y la diabetes. Son factores de progresión la proteinuria persistente, la HTA mal controlada, el tabaquismo, la dislipemia, la anemia, la enfermedad cardiovascular y la obesidad.

Constituyen factores de estadio final la anemia, la hipoalbuminemia y la derivación tardía a nefrología (35).

3.2.4 Etiología

El enfoque tradicional de la ERC consiste en categorizar la etiología como prerrenal, con perfusión renal disminuida; renal intrínseca, producida por patología de los vasos sanguíneos, de los glomérulos o de los túbulos; o post-renal, causada por patología obstructiva (37).

La enfermedad prerrenal se presenta en pacientes con insuficiencia cardíaca o cirrosis, con disminución persistente de la perfusión renal, lo que aumenta la propensión a lesión renal intrínseca como por ejemplo necrosis tubular aguda.

La enfermedad vascular renal crónica más común es la nefroesclerosis o nefropatía asociada a la hipertensión esencial. Implica en principio a los vasos sanguíneos, pero en última instancia daña glomérulos, túbulos e intersticio. La estenosis de la arteria renal puede, en el transcurso de meses o años, causar nefropatía isquémica, caracterizada por glomeruloesclerosis y fibrosis tubulointersticial.

La nefropatía diabética se desarrolla como consecuencia de los altos niveles de glucosa y de productos finales de glicación, entre otras causas. Se produce expansión mesangial, engrosamiento de la membrana basal glomerular y glomeruloesclerosis.

La enfermedad tubulointersticial intrínseca más común es la poliquistosis renal. Engloba varias enfermedades hereditarias causadas por mutaciones en los genes PKD1 o PKD2, caracterizadas por el desarrollo de quistes renales acompañados por el declive de la función renal. Otras patologías con afectación tubulointersticial son la nefrocalcinosis, la sarcoidosis y el síndrome de Sjögren.

La obstrucción crónica puede ser debida a enfermedad prostática o a cáncer metastásico. Si no se trata, la nefropatía obstructiva conduce a fibrosis tubulointersticial irreversible.

En la cohorte de 2341 pacientes del estudio multicéntrico ANSWER, llevado a cabo en España, la principal causa de ERC avanzada en tratamiento sustitutivo fue nefropatía diabética (26%), seguida de enfermedad renal hipertensiva (17%), glomerulonefritis (11%), poliquistosis renal (7%), pielonefritis crónica (6%) y

enfermedad sistémica (4%). La etiología fue desconocida en el 21% de los pacientes (38).

3.2.5 Tratamiento

El manejo del paciente con ERC incluye las siguientes intervenciones: el tratamiento de las causas reversibles del fallo renal, la prevención o el enlentecimiento de la progresión de la enfermedad, el tratamiento de las complicaciones, el ajuste de dosis de fármacos según la tasa de filtrado glomerular y la identificación y preparación adecuada del paciente que va a necesitar tratamiento renal sustitutivo (39).

Las medidas para demorar la progresión de la ERC van dirigidas hacia los factores de riesgo cardiovascular y renal: estilo de vida, control de la presión arterial, de la glucemia, uricemia, acidosis y dislipemia, e interrupción del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA).

3.2.6 Enfermedad renal crónica avanzada

Se conoce como enfermedad renal avanzada a la fase en la que los síntomas solo pueden ser tratados por diálisis o trasplante renal, generalmente cuando el filtrado glomerular es inferior a 10 o 15 mL/min/1,73m². Los signos y síntomas comunes en esta fase que no responden a tratamiento distinto al sustitutivo son el declive del estado nutricional, sobrecarga de volumen, fatiga, malestar, deterioro cognitivo moderado, acidosis refractaria, hiperkalemia e hiperfosfatemia (40).

Las guías internacionales coinciden en recomendar la preparación de los pacientes con ERC avanzado para diálisis, trasplante o tratamiento conservador antes de que la enfermedad se vuelva sintomática (39,41). La identificación temprana de los pacientes que necesitarán diálisis puede disminuir la morbilidad y la mortalidad, ya que permite iniciar el tratamiento en el momento óptimo, con un adecuado acceso vascular, además de proporcionar tiempo para el reclutamiento y evaluación de los miembros de la familia que podrían ser donantes de riñón.

El paciente debería recibir información incluyendo las ventajas y desventajas de la hemodiálisis, la diálisis peritoneal y el trasplante renal. También se debería discutir la opción del tratamiento conservador con los pacientes que no quieren o no pueden someterse a la terapia de reemplazo renal.

3.2.7 Tratamiento sustitutivo

El tratamiento renal sustitutivo se consigue mediante diálisis, que se basa en la difusión y ultrafiltración de componentes y agua a través de una membrana semipermeable para eliminar desechos metabólicos y exceso de agua y reponer compuestos como el bicarbonato. En la hemodiálisis (HD), el sistema de depuración es extracorpóreo. Se emplea un dializador para exponer la sangre del paciente a la membrana semipermeable y, a través de ésta, al baño de diálisis. En la diálisis peritoneal (DP) la membrana semipermeable es el peritoneo del paciente.

Hemodiálisis

El equipo para hemodiálisis consiste en un dializador, baño de diálisis o dializado, conducciones para el transporte de los fluidos y el aparato para el bombeo y monitorización de sangre y dializado a través del dializador (42–46).

El aclaramiento de solutos desde el compartimento intravascular se consigue por difusión y convección. La difusión es la vía principal y depende de la interacción entre sangre y dializado a través de los poros de la membrana del dializador. La difusión de solutos se produce a favor de un gradiente de concentración de sangre a dializado y de dializado a sangre. Sangre y dializado fluyen en direcciones opuestas a través del dializador a velocidades de 300 a 500 mL/min y de 500 a 800 mL/min, respectivamente, para maximizar el aclaramiento de solutos.

El exceso de agua de la sangre se elimina a través de un gradiente de presión hidrostática. La presión transmembrana fuerza al fluido a moverse del compartimento con alta presión, el sanguíneo, al de baja presión, el del dializado, fenómeno conocido como ultrafiltración.

Con la ultrafiltración se favorece el transporte por convección de solutos, con una contribución importante a la eliminación de solutos grandes.

Las técnicas de diálisis utilizadas se clasifican en dos grandes grupos según predomine el principio de difusión (hemodiálisis) o de convección (técnica convectiva).

La hemodiálisis es una técnica fundamentalmente difusiva. La superficie del dializador, el flujo de sangre y en menor medida el flujo del baño de diálisis son los factores que regulan la difusión de los pequeños solutos. La eliminación de medianas y

grandes moléculas por difusión es menos eficaz y depende fundamentalmente de la permeabilidad de la membrana.

Las técnicas convectivas surgen con la finalidad de aumentar la eliminación de las moléculas de mediano y gran tamaño que se depuran mal por difusión. La transferencia de solutos en la convección se realiza mediante el principio de arrastre por flujo y depende del tamaño del poro de la membrana y de la tasa de ultrafiltración. Las técnicas convectivas usan una membrana de gran permeabilidad y realizan una ultrafiltración superior a la necesaria para eliminar el líquido acumulado por el paciente entre dos sesiones de diálisis. El exceso de volumen extraído debe ser repuesto con un líquido de reposición de composición fisiológica. La técnica convectiva más utilizada es la hemodiafiltración *on line*, en la que el líquido de reposición es baño de diálisis.

Diálisis peritoneal

El peritoneo es la membrana semipermeable en este tipo de diálisis. El líquido de diálisis se introduce en la cavidad peritoneal a través de un catéter y el intercambio de solutos se produce por difusión entre los vasos sanguíneos en contacto con el peritoneo y el dializado. La velocidad de difusión de los solutos es mayor cuanto menor es su tamaño. El líquido de diálisis peritoneal contiene agentes osmóticos, glucosa el más utilizado, creando un gradiente osmótico que permite la eliminación neta de agua. También contiene compuestos que actúan como tampón, típicamente lactato, y electrolitos.

Las principales modalidades de diálisis peritoneal son la continua y la intermitente. En la continua ambulatoria, se realizan usualmente de tres a cinco intercambios de dializado durante el día y la última infusión permanece en el abdomen durante la noche. La diálisis peritoneal automatizada utiliza una cicladora para realizar múltiples intercambios durante la noche, con reposo durante el día o un intercambio extra.

La diálisis peritoneal es eficaz en la depuración de toxinas urémicas y en el mantenimiento de un balance hidrosalino adecuado. Se acompaña además de una mayor función renal residual, estabilidad hemodinámica, control tensional, dieta más liberal que permite un balance nitrogenado positivo y una ingesta calórica adecuada, menor grado de anemia, prevención de la enfermedad ósea renal a largo plazo y optimización de la calidad de vida al ser un tratamiento domiciliario con mayor independencia (47).

3.3 Determinación de selenio en plasma o suero

La técnica más extendida para la determinación de selenio total es la espectrometría de absorción atómica electrotrémica (ETAAS), por la posibilidad que ofrece de análisis directo de este elemento en muestras biológicas. La espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) es otra técnica en auge para la determinación de selenio. Otras técnicas empleadas requieren tratamiento previo de la muestra, siendo menos idóneas para su empleo en laboratorios clínicos. Es el caso de la fluorometría y de la espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros. En 161 trabajos europeos publicados entre 1972 y 2009 en los que se analizó el selenio sérico o plasmático de sujetos sanos, se empleó ETAAS en el 64% de ellos, fluorometría en el 19% y análisis de activación por neutrones (AAN) en el 12%. Todos los estudios que emplearon AAN se publicaron antes de 1991 y el 87% de los que utilizaron fluorometría se publicaron entre 1981 y 1990 (48). En la revisión similar que llevé a cabo de estudios europeos publicados a partir de 2010 que incluyeran el análisis de selenio en plasma, suero, orina y pelo en sujetos sanos, encontré 22 publicaciones que cumplieron los criterios. En 15 de ellas, el 68%, se empleó ICP-MS para el análisis (49).

3.3.1 Espectrometría de absorción atómica en cámara electrotrémica

Esta técnica es la más utilizada debido a la gran ventaja de no necesitar pretratamiento de la muestra, además de emplear pequeños volúmenes de muestra. Destaca el manejo sencillo de los espectrofotómetros en comparación con el resto de técnicas disponibles. Son necesarios métodos de corrección del fondo: la lámpara de deuterio no es suficiente para la corrección de las interferencias provocadas por el contenido en hierro y fosfatos del suero, mientras que la corrección por efecto Zeeman ofrece una mejor solución al problema. Es necesaria también la adición de modificadores de matriz que permitan la formación de seleniuros refractarios y el empleo, por tanto, de temperaturas de calcinación elevadas que permiten eliminar la mayor parte de la matriz. El modificador más utilizado en la actualidad es el paladio. Se han descrito límites de detección con esta técnica de 1,6 µg/L (50,51).

3.3.2 Obtención y almacenaje de las muestras

El riesgo de contaminación de las muestras para análisis de selenio es muy bajo, a diferencia de lo que ocurre con otros elementos traza, y pueden utilizarse envases convencionales para el almacenaje de las muestras. Son aptos para la toma de muestras jeringas o tubos de vacío de polipropileno, cloruro de polivinilo o poliestireno y agujas de acero inoxidable. El uso de heparina o de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulantes para la obtención de plasma no produce diferencias significativas con respecto a la medición en suero, pero sí el citrato (52). El contacto del plasma o suero con gel separador, presente en tubos habituales de recogida de muestras de suero y plasma para laboratorio clínico, no produce tampoco diferencias significativas en la concentración de selenio (53). Las muestras hemolizadas deben ser descartadas porque con la hemólisis se produce una elevación del selenio por liberación desde los eritrocitos.

La concentración de selenio se mantiene estable durante 3 días cuando las muestras se almacenan a 4°C, disminuyendo significativamente a partir de 7 días y drásticamente después de 20 jornadas. Las muestras congeladas a -20°C son estables durante meses (52).

3.3.3 Preparación de las muestras

En general, el único tratamiento de las muestras previo al análisis por ETAAS suele ser una dilución, habitualmente con el modificador de matriz y con Triton X-100, que es un surfactante que elimina problemas en la dispensación en la cámara y mejora el contacto con la superficie de grafito. Aumentando la dilución baja la absorción de fondo y debe seleccionarse aquella dilución que proporciona mayor sensibilidad con menor señal de fondo. Las diluciones más empleadas se encuentran entre 1:3 y 1:20. La concentración máxima de Triton X-100 que se inyecta es 0,25% (52).

3.3.4 Medición

La línea de resonancia de selenio con mayor sensibilidad es la de 196,03 nm. La medida de la absorbancia se hace con más frecuencia en altura de pico que en área de pico porque se obtiene mayor sensibilidad. A la mencionada longitud de onda, son interferentes espectrales importantes el fosfato y el hierro y la corrección de fondo es ineludible. Otras líneas de resonancia se ven menos afectadas por interferentes abundantes en el plasma sanguíneo pero la sensibilidad del resto de líneas es muy inferior.

Son muchos los métodos publicados que emplean corrección de la absorción de fondo con lámpara de deuterio, pero algunos autores consideran que la interferencia no se compensa adecuadamente y puede haber sobre-corrección. La señal de fondo de especies que se forman en el horno de grafito está estructurada en esta región del espectro electromagnético y puede haber un pico negativo en ausencia de selenio (54). Con deuterio, se recomienda la adición de fosfato a la calibración acuosa, medida que no aporta ningún beneficio cuando se dispone de corrección por Zeeman (52).

3.3.5 Modificación química

El selenio reacciona con muchos metales formando seleniuros estables, pudiéndose emplear como modificadores químicos. Se han publicado métodos con níquel, paladio, combinaciones de $\text{Pd/Mg(NO}_3)_2$, $\text{Cu/Mg(NO}_3)_2$, Pd/agente reductor, entre otros. Los distintos modificadores estabilizan en desigual grado el selenio orgánico y el inorgánico y la elección debe hacerse teniendo esto en cuenta. El Pd parece proporcionar la mayor sensibilidad y la mejor reproducibilidad, más aún cuando se combina con un agente reductor como el ácido ascórbico. Con reductores, sin embargo, se incrementan los problemas de obstrucción en el muestreador por reducción del paladio en el capilar, que precipita (52). El uso de paladio solo resultó en el mejor modificador en hornos *Perkin-Elmer*, con una sensibilidad similar para selenato y selenito y del 80% en la medición de selenometionina en varios estudios. En hornos *VARIAN*, la estabilización efectiva de todas las especies presentes en el plasma se produjo con paladio reducido con ácido ascórbico (54).

3.3.6 Programa de temperaturas

Muchos métodos descritos emplean dos etapas de secado para evaporar la muestra. La elevación gradual de la temperatura, tanto en el secado como en la calcinación, es más eficaz en la prevención de la volatilización del selenio que una elevación rápida de la temperatura seguida de una etapa larga de temperatura constante. En la Tabla 12 se muestran programas de temperatura publicados para la determinación de selenio total en suero. Las temperaturas de secado están en el rango 40 – 300 °C, las de calcinación entre 300 y 1350 °C y las de atomización entre 1900 y 2800 °C (52).

Tabla 3-7 Programas de temperaturas propuestos para la determinación de selenio total en suero por ETAAS.

Secado	Calcinación			Atomización		Nº Publicaciones
$\Delta T/^{\circ}\text{C}$	$\Delta T/^{\circ}\text{C}$	Gas purga	Flujo	$\Delta T/^{\circ}\text{C}$	Flujo de Ar	
60–180	800–1300	Ar	200–300	1900–2800	0–40	14
60–200	400	Ar	–	2850	–	1
90–300	500–800	Ar	50–300	2000–2700	0–10	5
	1050–1200	Ar	50–300			
80–120	500	O ₂	300	2700	0	1
	1200	Ar	300			
	20		0			
40–200	400	Ar	3000	2700	0	1
	500	Ar	3000			
	1200		0			
75–120	300	Ar	300–3000	2700	0	5
	1200	Ar	300–3000			
	1200		0			
110–120	450	Ar	300	2000	0	1
	1050	Ar	300			
	300		0			
80–140	500–550	O ₂ /air	300	2100–2300	0	4
	500–550	Ar	300			
	900–1350	Ar	300			
120	500	O ₂	50	2200	0	1
	500	Ar	300			
	1200	Ar	300			
	1200		0			
80–120	600	Ar	300	2200	0	1
	100	Ar	300			

Modificado de Sabé *et al* (2000) (52).

4.OBJETIVOS

4 Objetivos

El objetivo principal de esta tesis doctoral es el estudio de la utilidad de la medida del selenio sérico o plasmático en pacientes con enfermedad renal crónica en fase de prediálisis y en tratamiento sustitutivo con alguna modalidad de diálisis del área de referencia del Hospital Universitario Severo Ochoa de Leganés, en la Comunidad de Madrid.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

1. La puesta a punto y validación de un método de determinación de selenio en suero y plasma por espectrometría de absorción atómica electrotrémica.
2. Determinar los valores de referencia de selenio sérico o plasmático en adultos del área geográfica.
3. Comparar los niveles de selenio de pacientes adultos con enfermedad renal crónica estadios 4 o 5 con los de sujetos control sin enfermedad renal ni otras como diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, tiroidea o neoplásica.
4. Determinar si valores bajos de selenio plasmático se relacionan con un aumento de la mortalidad en pacientes adultos con enfermedad renal crónica estadios 4 y 5.
5. Analizar las posibles asociaciones entre el selenio plasmático de los pacientes y los marcadores bioquímicos del estado nutricional e inflamatorio empleados en el seguimiento de estos pacientes.
6. Comparar el selenio plasmático de pacientes con enfermedad renal crónica agrupados según estén o no en tratamiento crónico con estatinas.

5.MATERIAL Y MÉTODOS

5 Material y métodos

5.1 Valores de referencia en suero

Se recogieron 118 muestras de suero de sujetos adultos (rango de edad 26-93 años, media $59,9 \pm 14,3$) a los que se les realizó analítica solicitada desde atención primaria, aparentemente sanos y que cumplían los criterios de inclusión establecidos a priori:

- Sujetos > 18 años.
- Sin historia de enfermedad renal y con FGe por MDRD > 60 ml/min/1,73 m².
- Sin patología tiroidea.
- Sin historia de enfermedad cardiovascular.
- Sin diabetes mellitus.
- Sin patología prostática.
- Sin historia de neoplasia.

El grupo control constó de 39 hombres y 15 mujeres de 60 años o menos y 33 hombres y 31 mujeres mayores de 60 años.

Se aplicó el método no paramétrico del CLSI C28-A3 para la obtención de los valores de referencia (55). Se valoró la necesidad de obtener intervalos de referencia diferenciados para sexo o rango de edad por el método de Harris y Boyd y la aplicación del test z.

5.2 Población de estudio

Se trata de un estudio observacional de cohortes retrospectivo, realizado en el Hospital Universitario Severo Ochoa de Leganés, entre los años 2010 y 2016.

5.2.1 Estudio preliminar de pacientes en diálisis peritoneal

En un estudio preliminar se seleccionaron muestras de suero de 21 pacientes en tratamiento con diálisis peritoneal y de 23 sujetos sanos que cumplían los criterios de inclusión, a través de una búsqueda en el sistema informático de laboratorio (Omega 3000 de Roche *Diagnostics*) y comprobación del historial de manera sistemática hasta

completar el grupo de muestras, para la comparación de los niveles de selenio. Los criterios de inclusión para el grupo control fueron los siguientes:

- Sujetos > 18 años.
- Sin enfermedad renal. Creatinina sérica < 1,2 mg/dL en hombres y <1,1 mg/dL en mujeres.
- Sin malnutrición u obesidad.
- Sin historia de enfermedad cardíaca.
- Sin cáncer.
- Sin enfermedad hepática. Niveles de transaminasas normales.
- Sin patología tiroidea. TSH normal.

Los criterios de inclusión para el grupo de pacientes fueron:

- Sujetos > 18 años.
- Tratamiento sustitutivo con diálisis peritoneal.

Las muestras se tomaron en tubo seco con gel separador. Una vez centrifugadas las muestras y terminados los análisis que tenían solicitados, se congeló una alícuota por muestra a -20°C hasta la posterior determinación de selenio.

Estimación del tamaño muestral

Previamente se encontró una diferencia entre la concentración media de un grupo de pacientes y la de un grupo control de 19 µg de selenio/L, además de una varianza del grupo control de 265 µg²/L².

La ecuación empleada para la estimación del tamaño para comparar dos medias fue la siguiente (56):

$$n = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta}).S^2}{d^2}$$

Donde:

- n: sujetos necesarios en cada grupo.
- Z_{α} : Valor Z correspondiente al riesgo deseado.
- Z_{β} : Valor Z correspondiente a la potencia deseada.
- S^2 : Varianza de la variable cuantitativa que tiene el grupo control.
- d: Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar.

Aceptamos un riesgo del 1% (error α) y deseamos un poder estadístico del 85% (error β) para detectar diferencias si es que existen. Así:

- $\alpha = 0,01$
- $\beta = 0,15$
- $d = 19 \mu\text{g/L}$
- $S^2 = 265 \mu\text{g}^2/\text{L}^2$
- $Z_{\alpha} = 2,576$

Con estos datos, $n = 19,2$. Precisamos al menos 20 sujetos en cada grupo.

5.2.2 Estudio observacional de cohortes retrospectivo

En mayo de 2016 se seleccionaron sistemáticamente los 102 pacientes del área sanitaria de Leganés que cumplían los siguientes requisitos:

- Tenían una determinación de selenio plasmático en una analítica realizada entre mayo de 2010 y mayo de 2011.
- Eran mayores de 18 años en el momento de la analítica.
- Tenían un diagnóstico de enfermedad renal crónica en estadio 4 o 5 en el momento de la analítica.

Las variables epidemiológicas y analíticas seleccionadas de los pacientes se recogieron en una base de datos, que se anonimizó irreversiblemente (57).

Se obtuvo la aprobación del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Hospital Universitario Severo Ochoa.

5.3 Variables recogidas

5.3.1 Variables epidemiológicas

De los pacientes del estudio observacional retrospectivo se recogieron los siguientes datos demográficos y epidemiológicos: edad, sexo, hábito tabáquico, fecha de inicio de diálisis, meses en diálisis, etiología de la ERC, antecedentes de hipertensión arterial, diagnóstico de diabetes mellitus, de patología tiroidea, de patología prostática, antecedentes de enfermedad cardiovascular (historia de cardiopatía isquémica, de insuficiencia cardíaca, de enfermedad vascular periférica o enfermedad cerebrovascular), de cáncer, tratamiento con estatinas y mortalidad.

Se consideró historia de insuficiencia cardíaca si así había sido diagnosticado por la presencia de síntomas o por evidencia de disfunción ventricular izquierda con fracción de eyección $< 45\%$ mediante ecocardiograma.

Se consideró historia de enfermedad vascular periférica en pacientes con claudicación intermitente, estenosis de arterias principales de miembros inferiores, presencia de úlceras causadas por enfermedad aterosclerótica, revascularización o amputaciones por isquemia.

Se consideró historia de enfermedad cerebrovascular el accidente cerebrovascular isquémico o hemorrágico, accidente isquémico transitorio o estenosis carotídea $> 70\%$.

5.3.2 Variables analíticas

Se recogieron los resultados de la determinación de selenio, urea, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicéridos, proteínas totales, albúmina, calcio, fosfato, hierro, ion sodio, ion potasio, proteína C reactiva (PCR), parathormona (PTH), prealbúmina y hemoglobina, según estuvieran solicitados por el médico peticionario de la analítica.

5.4 Muestras

Las muestras se recogieron en tubo seco con gel separador (suero), en tubo con heparina de litio y gel separador (plasma) y en tubo con K3-EDTA (sangre total). Las muestras de suero y plasma se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. Los distintos parámetros se determinaron en las horas siguientes a la extracción de la muestra

salvo el selenio. Se congeló una alícuota por muestra en tubo seco para determinación de metales, a -20°C hasta la medición de selenio.

5.5 Sistemas analíticos, métodos y reactivos

5.5.1 Analizadores

Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer modelo 4100ZL, con cámara de grafito con calentamiento transversal, corrección de fondo por efecto *Zeeman* longitudinal y automuestreador AS 71 para la determinación de selenio. Tubos de grafito pirolítico *end-capped*, con plataforma L'vov integrada. Lámpara de descarga sin electrodos de selenio con fuente de alimentación a 240 mA.

Espectrofotómetro de absorción atómica VARIAN SpectrAA-300, con cámara de grafito con calentamiento longitudinal y corrección de fondo por *Zeeman* transversal para la determinación de selenio. Cámaras pirolizadas con plataforma L'vov incorporada. Lámpara de cátodo hueco de selenio con fuente de alimentación a 8 mA.

Analizador Modular *Analytics* SWA de Roche *Diagnostics*, con módulo de medida de electrolitos ISE900, módulo de medida fotométrica D2400, módulo de medida fotométrica P800 y módulo de inmunoanálisis heterogéneo E170, para la determinación de urea, creatinina, ácido úrico, colesterol total, triglicéridos, proteínas totales, albúmina, calcio, fosfato, hierro, ion sodio, ion potasio, PCR y prealbúmina en suero y plasma.

Analizador de electroquimioluminiscencia Cobas e411 de Roche *Diagnostics* para la medición de PTH en suero y plasma.

Contador hematológico Advia 2120 de Siemens Healthcare Diagnostics para el análisis de hemoglobina en sangre total.

5.5.2 Métodos y reactivos de los autoanalizadores

Urea: UREA/BUN, Kinetic UV assay for urea/urea nitrogen, ref. 11929496 216. Método cinético de punto final que emplea ureasa y glutamato deshidrogenasa, con medida de la reducción de la absorbancia (700/340nm) debida al consumo de NADH.

Reactivos: R1: Tampón ácido 3-[ciclohexilamino]-2-hidroxi-1-propanosulfónico 5 mmol/L, pH 9,65; NADH (levadura) $\geq 0,23$ mmol/L; conservante. R2: Tampón N,N-bis(2-hidroxietil)-glicina 1000 mmol/L, pH 7,6; ureasa (*Canavalia ensiformis*) ≥ 120 μ kat/L; GLDH (hígado bovino) $\geq 15,0$ μ kat/L; α -cetoglutarato $\geq 8,3$ mmol/L; conservante.

Calibración: S1: NaCl al 0,9 % y S2: C.f.a.s. (Calibrator for automated systems), ref. 10759350 190.

Controles de calidad internos: Precinorm U plus, ref. 12149435 122 y Precipath U plus, ref. 12149443 122.

Intervalo de medición: 5 – 400 mg/dL de urea.

Creatinina: CREA plus, Creatinina plus, ref. 11875566 216. Método enzimático colorimétrico basado en la conversión de la creatinina en glicina, formaldehído y peróxido de hidrógeno por la acción de la creatininasa, creatinasa y sacrosina oxidasa, acoplado a la formación de un cromógeno de quinonimina por acción de la peroxidasa. Estandarizado frente a espectrometría de masas con dilución isotópica.

Reactivos: R1: Tampón ácido 3-[[tris(hidroximetil)metil]-amino]-propansulfónico 30 mmol/L; pH 8,1; creatinasa (microorganismos) ≥ 333 μ kat/L; sarcosina-oxidasa (microorganismos) ≥ 133 μ kat/L; ascorbato-oxidasa (microorganismos) ≥ 33 μ kat/L; catalasa (microorganismos) $\geq 1,67$ μ kat/L; HTIB 5,9 mmol/L; detergentes y conservante. R2: Tampón ácido 3-[[tris(hidroximetil)metil]-amino]-propansulfónico 50 mmol/L, pH 8,0; creatininasa (microorganismos) ≥ 500 μ kat/L; peroxidasa (rábano picante) $\geq 16,7$ μ kat/L; 4-aminofenazona 2,0 mmol/L; hexacianoferrato (II) de potasio 163 μ mol/L; detergente y conservante.

Calibración: S1: NaCl al 0,9 % y S2: C.f.a.s. (Calibrator for automated systems), ref. 10759350 190.

Controles de calidad internos: Precinorm U plus, ref. 12149435 122 y Precipath U plus, ref. 12149443 122.

Intervalo de medición en suero/plasma: 0,03 – 30 mg/dL.

Intervalo de medición en orina: 0,6 – 600 mg/dL

Ácido úrico: UA plus, Ácido úrico plus, ref. 11929429 216. Método enzimático colorimétrico que emplea uricasa para la oxidación del ácido úrico con formación de peróxido de hidrógeno que, en presencia de peroxidasa, oxida la 4-aminofenazona a un colorante de quinona-diimina.

Reactivos: R1: Tampón fosfato 0,05 mol/L, pH 7,8; N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilanilina 7 mmol/L; éter poliglicólico de alcohol graso 4,8 %; ascorbato oxidasa (EC 1.10.3.3; calabacín; 25 °C) $\geq 83,5 \mu\text{kat/L}$. R2: Tampón fosfato 0,1 mol/L, pH 7,8; hexacianoferrato (II) de potasio 0,30 mmol/L; 4-aminofenazona ≥ 3 mmol/L; uricasa (EC 1.7.3.3; *Arthrobacter protophormiae*; 25 °C) $\geq 83,4 \mu\text{kat/L}$; peroxidasa (POD) (EC 1.11.1.7; rábano picante; 25 °C) $\geq 50 \mu\text{kat/L}$.

Calibración: S1: NaCl al 0,9 % y S2: C.f.a.s. (Calibrator for automated systems), ref. 10759350 190.

Controles de calidad internos: Precinorm U plus, ref. 12149435 122 y Precipath U plus, ref. 12149443 122.

Intervalo de medición: 0,2 – 25 mg/dL.

Colesterol total: CHOL, Coolesterol CHOD-PAP, ref. 11875540 216. Método enzimático colorimétrico que determina colest-4-en-3-ona tras la hidrólisis de los ésteres de colesterol por la coolesterol esterasa, seguida de la transformación del colesterol por la coolesterol oxidasa y la medición subsiguiente del peróxido de hidrógeno formado a través de la reacción de Trinder: reacciona, en presencia de peroxidasa, con 4-aminofenazona y fenol para dar un colorante rojo.

Reactivo: R1: Tampón ácido piperacín-1,4-bis(2-etanosulfónico) 75 mmol/L, pH 6,8; Mg^{2+} 10 mmol/L; colato sódico 0,2 mmol/L; 4-aminofenazona $\geq 0,15$ mmol/L; fenol $\geq 4,2$ mmol/L; éter poliglicólico de alcohol graso 1 %; coolesterol esterasa (*Pseudomonas spec.*): $\geq 0,5$ U/mL; coolesterol-oxidasa (*E. coli*) $\geq 0,15$ U/mL; peroxidasa (rábano) $\geq 0,25$ U/mL; estabilizadores y conservante.

Calibración: S1: NaCl al 0,9 % y S2: C.f.a.s. (Calibrator for automated systems), ref. 10759350 190.

Controles de calidad internos: Precinorm U plus, ref. 12149435 122 y Precipath U plus, ref. 12149443 122.

Intervalo de medición: 3 – 800 mg/dL.

Triglicéridos: TG, ref. 11876023 216. Método enzimático colorimétrico basado en la hidrólisis de los triglicéridos a glicerol por una lipasa, seguido de oxidación a dihidroxiacetona fosfato y peróxido de hidrógeno que se mide a través de una reacción de Trinder.

Reactivos: R1: Tampón ácido piperazina -N,N'-bis (2-etanosulfónico) 50 mmol/L, pH 6,8; Mg^{2+} 40 mmol/L; colato sódico 0,20 mmol/L; ATP \geq 1,4 mmol/L; 4-aminofenazona \geq 0,13 mmol/L; 4-clorofenol 4,7 mmol/L; hexacianoferrato (II) de potasio 1 μ mol/L; éter poliglicólico de alcohol graso 0,65 %; lipasa lipoproteica (*Pseudomonas spec.*) \geq 5,0 U/mL; gliceroquinasa (*Bacillus stearothermophilus*) \geq 0,19 U/mL; glicerol fosfato oxidasa (*E. coli*) \geq 2,5 U/mL; peroxidasa (rábano picante) \geq 0,10 U/mL; conservante.

Calibración: S1: NaCl al 0,9 % y S2: C.f.a.s. (Calibrator for automated systems), ref. 10759350 190.

Controles de calidad internos: Precinorm U plus, ref. 12149435 122 y Precipath U plus, ref. 12149443 122.

Intervalo de medición: 4 – 1000 mg/dL.

Proteínas totales: TP, Total Protein, ref. 11929925 216. Método colorimétrico en el que el Cu^{2+} reacciona con los enlaces peptídicos de las proteínas a pH alcalino para dar un complejo purpúreo que se determina fotométricamente (basado en el método de Biuret).

Reactivos: R1: Hidróxido de sodio 400 mmol/L; tartrato sódico-potásico 89 mmol/L. R2: Hidróxido de sodio 400 mmol/L; tartrato sódico-potásico 89 mmol/L; yoduro potásico 61 mmol/L; sulfato de cobre 24,3 mmol/L.

Calibración: S1: NaCl al 0,9 % y S2: C.f.a.s. (Calibrator for automated systems), ref. 10759350 190.

Controles de calidad internos: Precinorm U plus, ref. 12149435 122 y Precipath U plus, ref. 12149443 122.

Intervalo de medición: 0,2 – 15,0 g/dL.

Albúmina: ALB PLUS, Albumin BCG method, ref. 11929640 216. Método colorimétrico en el que la albúmina reacciona con verde de bromocresol a pH=4,1 para formar un complejo azul verdoso que se mide fotométricamente.

Reactivos: R1: tampón citrato 95 mmol/L, pH 4,1; conservantes y estabilizadores. R2: tampón citrato 95 mmol/L, pH 4,1; verde de bromocresol 0,66 mmol/L; conservantes y estabilizadores.

Calibración: S1: NaCl al 0,9 % y S2: C.f.a.s. (Calibrator for automated systems), ref. 10759350 190.

Controles de calidad internos: Precinorm U plus, ref. 12149435 122 y Precipath U plus, ref. 12149443 122.

Intervalo de medición: 1,0 – 7,0 g/dL.

Calcio: CA2, Calcium Gen.2, ref. 05061466 190. Método colorimétrico a pH alcalino en el que el calcio reacciona con 5-nitro-5'-metil-BAPTA, formando un complejo que reacciona con EDTA y cuya aparición se mide por fotometría.

Reactivos: R1: ácido 3-[ciclohexilamino]2-hidroxi-1-propanosulfónico 57 mmol/L; NM-BAPTA 0,24 mmol/L; pH 10,0; agente tensioactivo no reactivo, conservante. R2: EDTA 7,5 mmol/L; pH 7,3; agente tensioactivo no reactivo, conservante.

Calibración: S1: NaCl al 0,9 % y S2: C.f.a.s. (Calibrator for automated systems), ref. 10759350 190.

Controles de calidad internos: Precinorm U plus, ref. 12149435 122 y Precipath U plus, ref. 12149443 122.

Intervalo de medición: 0,8 – 20,1 mg/dL.

Fosfato: PHOS, Inorganic phosphorus, ref. 11875949 216. Método colorimétrico según el cual el fosfato reacciona con el molibdato de amonio en presencia de ácido sulfúrico para dar un complejo que se determina fotométricamente a 340 nm.

Reactivos: R1: Ácido sulfúrico 0,36 mol/L; detergente. R2: Molibdato amónico 3,5 mmol/L; ácido sulfúrico 0,36 mol/L; cloruro sódico 150 mmol/L.

Calibración: S1: NaCl al 0,9 % y S2: C.f.a.s. (Calibrator for automated systems), ref. 10759350 190.

Controles de calidad internos: Precinorm U plus, ref. 12149435 122 y Precipath U plus, ref. 12149443 122.

Intervalo de medición: 0,3 – 20,0 mg/dL.

Hierro: Fe, Hierro, ref. 11876996 216. Método colorimétrico por el que el Fe^{3+} unido a transferrina se libera al añadir medio ácido y detergentes, se reduce a Fe^{2+} por acción del ácido ascórbico y se compleja con FerroZine para dar un compuesto que se detecta por fotometría.

Reactivos: R1: Ácido cítrico 200 mmol/L; tiourea 115 mmol/L; detergente. R2: Ascorbato sódico 150 mmol/L; FerroZine 6 mmol/L; conservante.

Calibración: S1: NaCl al 0,9 % y S2: C.f.a.s. (Calibrator for automated systems), ref. 10759350 190.

Controles de calidad internos: Precinorm U plus, ref. 12149435 122 y Precipath U plus, ref. 12149443 122.

Intervalo de medición: 5 – 1000 $\mu\text{g/dL}$.

Ion sodio: ISE indirect Na for gen.2, ref. 10825468 001. Se determina por potenciometría indirecta con un electrodo selectivo con membrana de PVC que contiene un transportador neutro de Na^+ .

Calibración: S1: ISE Standard Low, ref. 11183974 216. S2: ISE Standard High, ref. 11183982 216. S3: ISE Compensator, ref. 11489828 216.

Controles de calidad internos: Precinorm U plus, ref. 12149435 122 y Precipath U plus, ref. 12149443 122.

Intervalo de medición: 80 – 180 mmol/L.

Ion potasio: ISE indirect K for gen.2, ref. 10825441 001. Se determina por potenciometría indirecta con un electrodo selectivo con membrana de PVC que contiene valinomicina como transportador selectivo de K^+ .

Calibración: S1: ISE Standard Low, ref. 11183974 216. S2: ISE Standard High, ref. 11183982 216. S3: ISE Compensator, ref. 11489828 216.

Controles de calidad internos: Precinorm U plus, ref. 12149435 122 y Precipath U plus, ref. 12149443 122.

Intervalo de medición: 1,5 – 10 mmol/L.

PCR: CRPL3, Tina-quant C-Reactive Protein Gen.3, ref. 04956885 190. Método inmunturbidimétrico en el que la PCR humana se aglutina con partículas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales anti-PCR.

Reactivos: R1: Tampón Tris(hidroximetil)-aminometano con albumina de suero bovino, conservantes. R2: Partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti-PCR (ratón) en tampón glicina; inmunoglobulinas (ratón); conservante.

Calibración: S1: NaCl al 0,9 % y S2: C.f.a.s. Proteins, ref. 11355279 216.

Controles de calidad internos: Precinorm Protein, ref. 10557897 122 y Precipath Protein, ref. 11333127 122.

Intervalo de medición: 0,3 – 350 mg/L.

Prealbúmina: Prealbumin, Tina-quant Prealbumin, ref. 06327524 190. Inmunoensayo turbidimétrico en el que anticuerpos anti-prealbúmina reaccionan con el antígeno de la muestra para formar un complejo que aglutina y se detecta por turbidimetría.

Reactivos: R1: Tampón fosfato 12,7 mmol/L, pH 7,2; NaCl 0,13 mol/L; PEG 60 g/L; conservante. R2: anticuerpo anti-prealbúmina humana (conejo) > 0,55 g/L; NaCl 0,10 mol/L; conservante.

Calibración: S1: NaCl al 0,9 % y S2: C.f.a.s. PAC (Calibrator for automated systems), ref. 03555941 190.

Controles de calidad internos: Precinorm Protein, ref. 10557897 122 y Precipath Protein, ref. 11333127 122.

Intervalo de medición: 7 – 80 mg/dL.

PTH: PTH (1-84), ref. 05608546 190. Inmunoensayo electroquimioluminiscente de tercera generación que mide la molécula intacta. Es un inmunoensayo tipo sándwich en el que un anticuerpo monoclonal biotinilado reacciona con el fragmento N-terminal de la PTH y un anticuerpo monoclonal marcado con un complejo de rutenio reacciona con el fragmento C-terminal. La biotina se une a la estreptavidina que recubre unas partículas magnéticas. Se detecta la emisión quimioluminiscente del complejo de rutenio.

Reactivos: M: micropartículas recubiertas de estreptavidina 0,72 mg/mL; conservante. R1: anticuerpo monoclonal anti-PTH biotinilado (ratón) 2,0 mg/L; tampón fosfato 100 mmol/L, pH 7,0; conservante. R2: anticuerpo monoclonal anti-PTH (ratón) marcado con Tris(2,2'-bipiridil)rutenio(II) 1,0 mg/L; tampón fosfato 100 mmol/L, pH 7,0; conservante.

Calibración: PTH 1-84 CalSet, ref. 05608554190.

Controles de calidad internos: Precicontrol Bone 1-3, ref. 11972227 122.

Intervalo de medición: 5,50 – 2300 pg/mL.

Hemoglobina: ADVIA CN-FREE HGB, TIME PAC RECUENTO sin/CN RBC, ref. 08008297. Método colorimétrico. Los hematíes se lisan para liberar la hemoglobina y el ion ferroso del grupo hemo se oxida a férrico, que coordina un grupo hidroxilo y una molécula de agua para formar monoacuomonohidroxiferriporfirina como producto de la reacción, que se detecta por fotometría a 565 nm.

Reactivo: CN-FREE HGB: óxido de dimetil-laurilamina 2,0%.

Calibración: ADVIA OPTIpoint, ref. T03-3682-54.

Controles de calidad internos: 3.in.1 TESTpoint, norm ref. 01964346, abn1 ref. 09459683 y abn2 ref. 03410380.

Intervalo de medición: 0,0 a 22,5 g/dL.

5.5.3 Reactivos para la determinación de selenio

- Agua milliQ. Todas las disoluciones fueron preparadas con agua ultrapura de resistividad específica de $18 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ obtenida utilizando un sistema de purificación milliQ (Millipore corporation, Massachussets, EE UU).
- Disolución patrón de selenio de 1000 mg/L. SeO_2 en ácido nítrico 0,5M, Merck, Darmstadt, Alemania.
- Ácido nítrico, suprapur (65%). Merck, Darmstadt, Alemania.
- Nitrato de paladio. Modificador de nitrato de paladio, solución 1%. Perkin-Elmer, Shelton, Connecticut, EEUU.
- Nitrato de magnesio. Modificador de nitrato de magnesio, solución 1%. Perkin-Elmer, Shelton, Connecticut, EEUU.
- Ácido ascórbico. L(+) ácido ascórbico, suprapur. Merck, Darmstadt, Alemania.
- Cloruro de hidroxilamina. Hidroxilamonio cloruro, suprapur. Merck, Darmstadt, Alemania.
- Triton X-100. Polietilenglicol mono(p-1,1,3,3-tetrametilfenileter) para cromatografía gaseosa. Merck, Darmstadt, Alemania.
- Seronorm[®] Trace Elements Serum, nivel 1 ref. 201405 y nivel 2 ref. 203105. SERO AS, Billingstad, Noruega.

5.6 Análisis estadístico

Se empleó el método no paramétrico basado en percentiles para el cálculo del intervalo de referencia de selenio plasmático. En la valoración de la necesidad de partición del intervalo de referencia se usaron el test z y el test t de Student. La correlación entre selenio sérico y edad se estimó mediante el estadístico Rho de Spearman.

Se realizó un análisis descriptivo de las variables recogidas para conocer las características generales de la población de estudio. Los datos se presentan utilizando estadísticos de tendencia central y de dispersión: media y desviación típica para variables cuantitativas que se ajustan a una distribución normal y mediana y rango intercuartílico (RIC) para las que no se ajustan. Se informan también los valores extremos.

Se empleó el test de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Lilliefors para la verificación de la normalidad de las distribuciones.

Se compararon los resultados de selenio plasmático entre los grupos de pacientes y los grupos control mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney, así como entre grupos de pacientes en tratamiento o no con estatinas.

La mediana de seguimiento de la cohorte de ERC se determinó mediante el método Kaplan-Meier de seguimiento potencial o *reverse* Kaplan-Meier (58).

El análisis de la mortalidad se realizó respetando las censuras de la muestra, incluyendo todas las personas que permanecen vivas en cada momento evolutivo. Se utilizó el método no paramétrico de Kaplan-Meier para estimar las supervivencias y el test Log Rank para el análisis comparativo de los distintos grupos. Los factores asociados a la probabilidad de muerte se analizaron aplicando el modelo de Cox condicional “hacia atrás” y el cálculo de *Hazard Ratios*.

Se compararon las características de los pacientes estratificados por hiposelenemia mediante el test χ^2 o prueba exacta de Fisher (tratamiento con estatinas, sexo, tratamiento sustitutivo, comorbilidades, alteraciones analíticas categorizadas y hábito tabáquico) y ANOVA (edad). Se empleó el test z con corrección de p por el método de Bonferroni para la comparación de proporciones de columna (modalidad de tratamiento sustitutivo).

Se analizó la asociación entre hiposelenemia y tratamiento crónico con estatinas mediante el cálculo del *Odds Ratio* por regresión logística binaria.

Se estimaron las correlaciones bivariadas entre el selenio y otros marcadores bioquímicos mediante el estadístico no paramétrico Rho de Spearman.

Se analizó conjuntamente la asociación de alteraciones en los parámetros bioquímicos con la existencia de hiposelenemia mediante el cálculo de *Odds Ratios* por regresión logística binaria no condicional.

EL análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete estadístico IBM SPSS *Statistics 22*. Todas las pruebas se realizaron en contraste bilateral y se consideraron significativos los valores de p inferiores a 0,05.

6.RESULTADOS

6 Resultados

6.1 Desarrollo de un método de determinación de selenio en suero en un equipo VARIAN

Para la determinación de selenio en suero en el estudio preliminar se desarrolló un método por absorción atómica en cámara electrotérmica en el espectrofotómetro VARIAN SpectrAA-300, a partir de los publicados en la bibliografía.

En una primera fase se puso a punto un programa de temperaturas para obtener la mejor señal de selenio, valorándose la forma y su reproducibilidad mediante el coeficiente de variación (CV). En la segunda fase se probó el programa con muestras de matriz sérica con contenido conocido de selenio y se varió el programa y el modificador de matriz hasta conseguir buena exactitud y precisión.

6.1.1 1ª fase

Se partió de una solución de paladio (0,1 g/L) y Tritón X-100 (0,1% v/v) en agua suprapura como modificador de matriz (50). El programa de temperaturas inicial fue el propuesto por la casa VARIAN para emplear en el modelo de espectrofotómetro con el que contamos (Tabla 5-1). La lectura de absorbancia se realiza a 196,0 nm. La intensidad de la fuente se fija en 8 mA y el ancho de rendija en 0,5 nm. Se emplean tubos de grafito pirolizado con plataforma L'vov incorporada.

Tabla 6-1. Programa de temperaturas de partida

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Flujo gas (L.min ⁻¹)	Tipo gas	Lectura
1	85	5	3	Argón	No
2	95	60	3	Argón	No
3	300	20	3	Argón	No
4	1200	10	3	Argón	No
5	1200	15	3	Argón	No
6	1200	1	0	-	No
7	2700	0,8	0	-	Sí
8	2700	1	0	-	Sí
9	2700	2	3	Argón	No

Optimización de la etapa de secado

Se optimizó la temperatura del paso 2 del programa, mediante el que se elimina el agua. Se introdujeron en la cámara 24 μL en total: 9 μL de estándar de selenio de 100 $\mu\text{g/L}$, 3 μL de un pool de sueros y 12 μL de modificador de matriz. Se realizaron las determinaciones por triplicado (Tabla 5-2). La absorbancia disminuye con el aumento de la temperatura del paso 2. No existe diferencia significativa entre las dos primeras temperaturas probadas, pero se seleccionó $T = 85\text{ }^{\circ}\text{C}$, con mayor absorbancia y menor CV.

Tabla 6-2. Temperatura del primer paso de secado

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Absorbancia media	CV
75	0,453	7,8%
85	0,456	7,0%
95	0,431	5,2%
105	0,428	1,3%
115	0,399	15,6%

Se probaron distintos tiempos para alcanzar la temperatura de secado (Tabla 5-3). La absorbancia aumentó de forma significativa a medida que se disminuyó el tiempo del paso 2 del programa hasta un máximo cuando se emplean 30 segundos, tiempo que se seleccionó.

Tabla 6-3. Tiempo del primer paso de secado

Tiempo (s)	Absorbancia media	CV
20	0,536	7,5%
25	0,542	6,4%
30	0,543	0,6%
35	0,541	6,7%
40	0,516	4,0%

45	0,511	2,5%
50	0,473	6,6%
55	0,473	3,8%
60	0,456	7,0%
65	0,466	8,5%
70	0,469	6,8%

El paso 3 consiste en una elevación de la temperatura con el objeto de eliminar otros compuestos con altos puntos de ebullición presentes en muestras de suero como oxoácidos (51). Se optimizaron la temperatura y el tiempo de esta etapa (Tablas 5-4 y 5-5).

Tabla 6-4. Temperatura del segundo paso de secado

Temperatura (°C)	Absorbancia media	CV
240	0,555	8,5%
270	0,563	2,2%
300	0,543	0,6%
330	0,528	4,1%
360	0,541	6,1%

Tabla 6-5. Tiempo del segundo paso de secado

Tiempo (s)	Absorbancia media	CV
16	0,559	7,0%
18	0,554	1,6%
20	0,563	2,2%
22	0,572	3,9%
24	0,489	13,0%

Se seleccionaron $T = 270\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $t = 22$ segundos para el paso 3 del programa.

Optimización de la etapa de calcinación

6.1.1..1 Modificador de matriz.

Hasta ahora se inyectaban $1,2\text{ }\mu\text{g}$ de paladio, los contenidos en $12\text{ }\mu\text{L}$ de modificador. En el siguiente experimento se optimizó la cantidad de paladio a añadir para obtener la máxima señal de la muestra (Tabla 5-6).

Tabla 6-6. Cantidad de paladio añadida en cada medición

Cantidad de paladio (μg)	Volumen de modificador inyectado (μL)	Absorbancia media	CV
1,0	10	0,464	2,8 %
1,1	11	0,486	4,1 %
1,2	12	0,495	4,6 %
1,3	13	0,507	7,3 %
1,4	14	0,490	8,5 %
1,5	15	0,511	5,8 %
1,6	16	0,520	5,8 %
1,7	17	0,499	6,1 %

La cantidad óptima de paladio a añadir a la muestra, conteniendo $0,9\text{ ng}$ de selenio más el presente en el pool de sueros, fue de $1,6\text{ }\mu\text{g}$. Se programó el muestreador para añadir $16\text{ }\mu\text{L}$ de modificador a cada punto del calibrado y a cada muestra a medir.

Se comprobó el efecto de la proporción de Tritón X-100 en el modificador (Tabla 5-7), y se mantuvo el contenido que se había utilizado hasta el momento.

Tabla 6-7. Contenido en Tritón X-100 del modificador

% Tritón X-100	Absorbancia media	CV
0,05	0,506	4,3 %
0,10	0,520	5,8 %
0,15	0,504	5,8 %

6.1.1.2 Temperatura y tiempo de calcinación

Una vez elegido el volumen de modificador y su contenido se optimizó la etapa de calcinación (Tablas 5-8, 5-9 y 5-10).

Tabla 6-8. Absorbancia del fondo según temperatura de calcinación

Temperatura de calcinación (°C)	Absorbancia del fondo
900	0,965
1000	0,372
1100	0,160
1200	0,170
1300	0,134
1400	0,124

Tabla 6-9. Absorbancia del estándar de 100 µg/L de selenio según temperatura de calcinación

Temperatura de calcinación (°C)	Absorbancia media	CV
900	0,151	4,2 %
1000	0,148	1,2 %
1100	0,152	7,3 %
1200	0,143	4,7 %
1300	0,127	11,8 %
1400	0,093	4,2 %

Se seleccionó la temperatura de 1100 °C a la que la absorbancia del fondo era ya notablemente menor que a temperaturas inferiores. Por encima de 1100 °C se produce una pérdida de selenio previa a la etapa de atomización que supondría una pérdida en la sensibilidad del método.

Tabla 6-10. Tiempo del paso de calcinación

Tiempo (s)	Absorbancia media	CV
14	0,579	3,2 %
17	0,593	6,1 %
20	0,593	1,8 %
23	0,546	11,6 %

Se obtuvieron absorbancias máximas a 17 y 20 segundos de calcinación a 1100 °C. Se seleccionó el tiempo de 17s al prevalecer la intención de determinar el selenio de la muestra en el menor tiempo posible.

Optimización de la etapa de atomización

Se probaron distintas temperaturas de atomización (Tabla 5-11). Se observó un incremento significativo de la absorbancia con el aumento de la temperatura de atomización hasta un máximo a 2800 °C, temperatura que se selecciona.

Programa de temperaturas al final de la 1ª fase

Tras la realización de los experimentos detallados anteriormente, se llegó al programa adaptado a nuestro espectrofotómetro, que supone el equilibrio entre eliminación de la matriz y preservación del selenio presente en la muestra para su determinación por absorción de la radiación de 196,0 nm en la etapa de atomización (Tabla 5-12).

Tabla 6-11. Optimización de la temperatura de atomización

Temperatura (°C)	Absorbancia media	CV
2000	0,076	14,6 %
2200	0,293	4,3%
2300	0,334	8,5 %
2400	0,399	1,4 %
2500	0,408	3,7 %
2600	0,432	0,9 %
2700	0,498	0,8 %
2800	0,524	6,4 %
2900	0,507	4,8 %

Tabla 6-12. Programa final de temperaturas

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Flujo gas (L.min ⁻¹)	Tipo gas	Lectura
1	80	5	3	Argón	No
2	85	30	3	Argón	No
3	270	22	3	Argón	No
4	1100	10	3	Argón	No
5	1100	17	3	Argón	No
6	1100	1	0	-	No
7	2800	0,9	0	-	Sí
8	2800	1	0	-	Sí
9	2800	4	3	Argón	No

Altura de pico vs. área de pico

Se determinó el mejor modo de medición de la señal producida. Se realizaron 10 réplicas en altura de pico y 10 en área de pico de la determinación de selenio en una mezcla conteniendo 9 µL de estándar de selenio de 100 µg/L, 3 µL de un pool de sueros y 16 µL de modificador de matriz (Tabla 5-13). Se escogió altura de pico, con una

precisión muy buena aunque inferior a la obtenida en área de pico, ya que la sensibilidad va a ser mayor (52).

Tabla 6-13. Altura vs. área de pico

	Absorbancia media	CV
Altura de pico	0,539	3,7 %
Área de pico	0,187	1,9 %

Adición estándar vs. calibración acuosa

Se determinó el método de calibración para la determinación de selenio en las muestras de suero. Para verificar la ausencia de interferencias provocadas por la matriz se comprobó que las pendientes de las rectas de regresión obtenidas por el método de adición estándar sobre varias mezclas de sueros no eran estadísticamente diferentes de la obtenida con los patrones acuosos en un mismo día (59). En las Tablas 5-14 y 5-15 se recogen los volúmenes inyectados para cada punto de los dos tipos de calibración.

Tabla 6-14. Programa del muestreador para adición estándar

	V estándar 200µg/L (µL)	V muestra (µL)	V blanco (µL)	V modificador (µL)
Blanco	-	-	12	16
Adición 1 (50 µg/L)	3	3	6	16
Adición 2 (100 µg/L)	6	3	3	16
Adición 3 (150 µg/L)	9	3	0	16
Adición 0	0	3	9	16

Modificador: Pd(NO₃)₂ 0,1 g/L, Tritón X-100 0,1% v/v. Blanco: agua suprapura.

Tabla 6-15. Programa del muestreador para calibración acuosa

	V estándar 200µg/L (µL)	V muestra (µL)	V blanco (µL)	V modificador (µL)
Blanco	-	-	12	16
Std 1 (50 µg/L)	3	-	9	16
Std 2 (100 µg/L)	6	-	6	16
Std 3 (150 µg/L)	9	-	3	16
Muestras	-	3	9	16

Modificador: Pd(NO₃)₂ 0,1 g/L, Tritón X-100 0,1% v/v. Blanco: agua suprapura.

Se realizaron sucesivamente una calibración acuosa, tres adiciones estándar con tres mezclas de suero diferentes y una última calibración acuosa. Las rectas de calibración obtenidas fueron las siguientes:

1ª calibración acuosa:

$$\text{Abs} = -0,0032 + 0,0044 \cdot \text{Conc}$$

$$R^2 = 0,9984$$

1ª adición estándar:

$$\text{Abs} = 0,141 + 0,0048 \cdot \text{Conc}$$

$$R^2 = 0,9947$$

2ª adición estándar:

$$\text{Abs} = 0,067 + 0,0041 \cdot \text{Conc}$$

$$R^2 = 0,9964$$

3ª adición estándar:

$$\text{Abs} = 0,102 + 0,0046 \cdot \text{Conc}$$

$$R^2 = 0,9823$$

2ª calibración acuosa:

$$\text{Abs} = 0,014 + 0,0043 \cdot \text{Conc}$$

$$R^2 = 0,9942$$

Se analizaron los datos mediante ANOVA y se obtuvo una significación $p = 0,619$. No hubo diferencia significativa entre las pendientes. Con este resultado se decidió trabajar con calibración frente a estándares acuosos.

6.1.2 2ª fase

Controles con concentración certificada de selenio

Se probó el método con controles Seronorm® Trace Elements Serum niveles 1 y 2 con cantidad certificada de selenio. Las concentraciones medidas estaban por debajo del rango aceptable por lo que se probaron cambios en la modificación del selenio.

Modificador de paladio y magnesio

Se observó mejora en la exactitud de la medida de selenio en controles cuando se añadió al modificador de paladio una cantidad de nitrato de magnesio (60), mientras que la recta de calibrado permaneció inalterada. El modificador contenía 0,1 g/L de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$, 0,1 g/L de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ y 0,1% de Tritón X-100 v/v.

Calibración con modificador de Pd:

$$\text{Abs} = -0,0015 + 0,0036 \text{ Conc}$$

$$R^2 = 0,9987$$

Calibración con modificador de Pd y Mg:

$$\text{Abs} = -0,0051 + 0,0040 \text{ Conc}$$

$$R^2 = 0,9926$$

Se determinó la cantidad óptima de modificador a añadir en cada punto. El volumen al que se obtuvo mayor absorbancia de un pool de sueros fue $V = 22 \mu\text{L}$. Dado que se modificó el volumen a introducir en la cámara, se repitieron los experimentos de

optimización de los tiempos, observándose que no era necesario ningún cambio (Tabla 5-16).

Tabla 6-16. Optimización de los tiempos del programa del horno con modificador de Pd y Mg

t (s)	Absorbancia media	CV
Secado. 85°C		
27	0,098	5,3%
30	0,105	4,0%
33	0,086	8,4%
Secado 2. 270°C		
20	0,096	5,3%
22	0,105	4,0%
24	0,092	11,3%
Calcinación. 1100°C		
17	0,105	4,0%
20	0,090	11,9%

Se procesaron varias veces sendos niveles de control, obteniéndose de media:

Nivel 1: 60,3 µg/L (Rango aceptable: 60,6 – 85,0 µg/L)

Nivel 2: 113,1 µg/L (121 – 137 µg/L)

Reducción de paladio con ácido ascórbico

El método seguía siendo inexacto, por lo que se probó a introducir en el método el uso de un reductor de paladio. El reductor elegido fue ácido L-ascórbico que produce un aumento en la señal de selenio y una disminución de la señal de fondo (52,61).

El ácido ascórbico y el paladio no pueden contactar antes de entrar en la cámara, porque se reduciría el paladio a Pd⁰, que precipita. Se decidió que las muestras, que el

muestreador diluía con el blanco (agua suprapura) en proporción 1:4, serían diluidas con el ácido ascórbico en la misma proporción 1:4 antes de su introducción en el equipo. Se probaron distintas concentraciones de ácido ascórbico y se eligió una concentración de 0,25% p/v, con la que se obtuvieron concentraciones de selenio en los controles aparentemente exactas y precisas, a validar en la siguiente etapa del trabajo.

Nivel 1, concentración media: 65,9 µg/L (60,6 – 85,0 µg/L)

Nivel 2, concentración media: 129,2 µg/L (121 – 137 µg/L)

Se realizó una calibración a partir de un estándar de selenio de 50 µg/L conteniendo 0,25% de ácido ascórbico y se comparó la ecuación de la recta con la obtenida con una calibración normal el mismo día. No hubo diferencia significativa entre las rectas, por lo que se decidió seguir empleando calibración acuosa como la diseñada anteriormente, con modificador de Pd y Mg, mientras que las muestras se diluirán con ácido ascórbico. El programa del muestreador para el método desarrollado es el expuesto en la Tabla 5-17.

Calibración acuosa:

$$\text{Abs} = - 0,0070 + 0,0040 \text{ Conc}$$

$$R^2 = 0,9875$$

Calibración con estándar de selenio conteniendo 0,25 % de ácido ascórbico:

$$\text{Abs} = - 0,0084 + 0,0043 \text{ Conc}$$

$$R^2 = 0,9932$$

Tabla 6-17. Programa final del muestreador

	V estándar 50µg/L (µL)	V muestra (µL)	V blanco (µL)	V modificador (µL)
Blanco	-	-	12	22
Std 1 (12,5 µg/L)	3	-	9	22
Std 2 (25 µg/L)	6	-	6	22
Std 3 (37,5 µg/L)	9	-	3	22
Muestras	-	9	-	22

Modificador: Pd(NO₃)₂ 0,1 g/L, Mg(NO₃)₂ 0,1 g/L, Tritón X-100 0,1% v/v. Blanco: agua suprapura. Muestras diluidas 1:4 con ácido ascórbico 0,25%.

6.1.3 Validación del método de medición de selenio

Se validó el método de medición de selenio desarrollado mediante la determinación de una serie de parámetros propuesta por la norma UNE-EN-ISO 17025 (59). Según esta norma, la validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto. Del método desarrollado debe conocerse principalmente el intervalo de trabajo, la linealidad, el efecto de la matriz, la inexactitud y la imprecisión. Se calcularon además el límite de detección instrumental y el límite de cuantificación.

Intervalo de trabajo y linealidad

Se realizó un calibrado con seis puntos de calibración, a tres réplicas por punto, para comprobar la linealidad del intervalo de trabajo.

Dado que la muestra de suero se diluye a un cuarto, al construir la curva de calibración se utilizaron los valores de los estándares multiplicados por cuatro. Así, los valores que devuelve la curva son directamente los del suero antes de la dilución. Las lecturas del estudio de linealidad se recogen en la Tabla 5-18. Las absorbancias de la tabla se corresponden en realidad con un cuarto de la concentración indicada.

Tabla 6-18. Estudio de linealidad

Concentración ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Absorbancia		
0	0,011	0,055	0,012
50,0	0,053	0,050	0,061
83,2	0,072	0,096	0,077
100,0	0,090	0,110	0,121
133,2	0,134	0,139	0,119
150,0	0,147	0,143	0,156

Se hizo un ajuste al modelo lineal para describir la relación entre absorbancia y concentración. La ecuación del modelo ajustado fue:

$$\text{Absorbancia} = 0,020 + 0,001 \times \text{Concentración}$$

Dado que el valor p en la tabla ANOVA fue inferior a 0,001, se concluyó que existe relación estadísticamente significativa entre absorbancia y concentración para un nivel de confianza del 99,9%.

El estadístico R^2 indicó que el modelo explica un 91,5% de la variabilidad en la absorbancia. El coeficiente de correlación fue igual a 0,957, indicando una relación fuerte entre las variables.

La hipótesis de independencia de los residuos se realiza mediante contraste de Durbin-Watson. El estadístico de Durbin-Watson fue igual a 2,258, valor próximo a 2 que sugiere que no hay indicio de autocorrelación en los residuos. El programa SPSS proporciona el valor del estadístico, pero no el p-valor asociado por lo que se recurre a las tablas correspondientes para confirmar la hipótesis (62). Los valores tabulados para $n = 18$ (tamaño muestral) y $k = 1$ (una variable dependiente) son $dL = 0,902$ y $dU = 1,118$. Dado que el estadístico Durbin-Watson fue superior a 2, se comprueba que no existe autocorrelación negativa, para lo que se calcula la cantidad:

$$4 - 2,258 = 1,742$$

El valor de esta diferencia se compara con los valores tabulados de dL y dU. Fue superior a ambos, por lo que se acepta que no existe autocorrelación de los residuos.

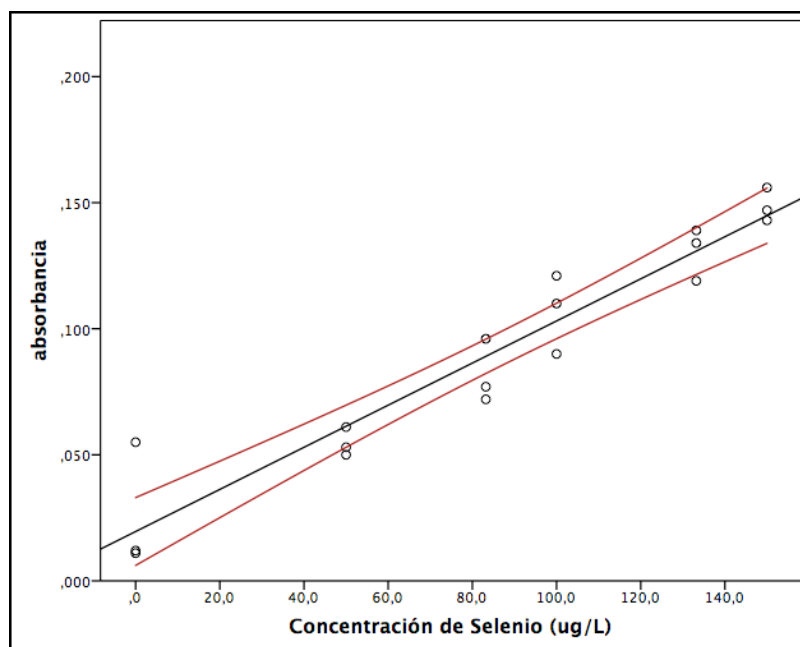


Figura 6-1. Representación de la recta de regresión lineal junto con valores de confianza de la media

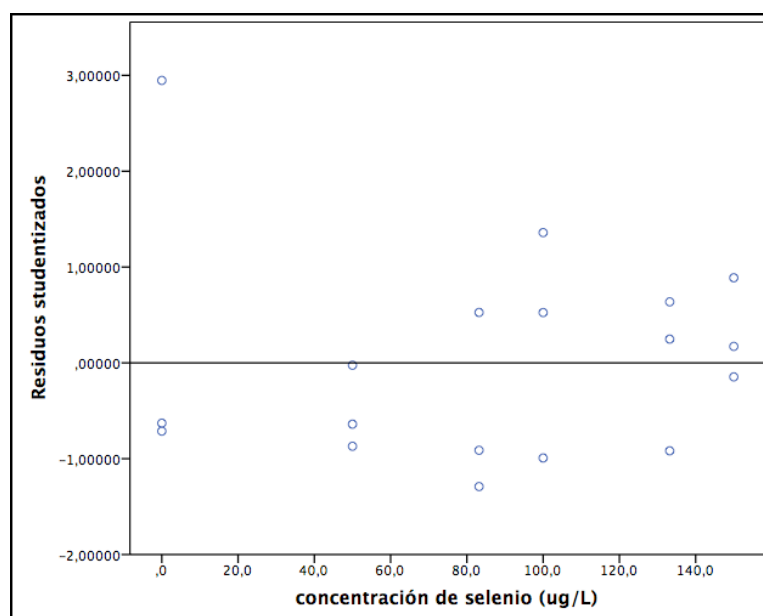


Figura 6-2. Residuos de la recta de regresión

Se pudo afirmar que la linealidad se mantenía al menos hasta 150 µg/L. Si en este intervalo de concentraciones se cumplen los requisitos de precisión y exactitud, el intervalo de trabajo se correspondería con el de linealidad.

Límite de detección y límite de cuantificación

Se calcularon el límite de detección instrumental (LD) y el límite de cuantificación estimado (LQ), para lo que se midieron treinta blancos. Se realizó una calibración teniendo en cuenta la dilución de las muestras (1:4). Para ello se multiplicaron las concentraciones de los puntos de calibración por el factor de dilución.

La media de absorbancia fue -0,013, la desviación estándar 0,003 y la pendiente de la recta de calibrado 0,00094 µg⁻¹.L.

$$LD = \frac{3,3 \times ds}{pendiente} = \frac{3,3 \times 0,003}{0,00094} = 11,1 \mu g/L$$

$$LQ = \frac{10 \times ds}{pendiente} = \frac{10 \times 0,003}{0,00094} = 33,7 \mu g/L$$

Ausencia de efecto matriz

La ausencia de efecto matriz se comprobó en el experimento en el que se comparó la adición estándar con la calibración frente a estándares acuosos. Las pendientes de las rectas obtenidas por el método de adición estándar sobre varias mezclas de sueros no diferían significativamente de las derivadas de calibraciones acuosas, demostrando que no hay efecto matriz en el método desarrollado.

Exactitud y precisión

Para la evaluación simultánea de la exactitud y la precisión se analizaron dos controles Seronorm® *Trace Elements Serum* niveles 1 y 2, por triplicado y con calibraciones diferentes, durante 15 días, siguiendo las recomendaciones ISO. Antes de aplicar las fórmulas, se descartó la presencia de valores aberrantes.

Tabla 6-19. Evaluación de la precisión y la exactitud

Día	Nivel1 (µg/L)	Media (µg/L)	Día	Nivel 1 (µg/L)	Media (µg/L)	Día	Nivel 2 (µg/L)	Media (µg/L)	Día	Nivel 2 (µg/L)	Media (µg/L)
1	58,2	58,8	9	62,3	61,5	1	135,6	129,2	9	125,7	129,2
	61,8			58,5			128,4			124,2	
	56,5			63,7			123,6			137,7	
2	59,8	60,1	10	54,5	56,6	2	124,0	126,3	10	124,9	124,6
	57,7			58,3			123,0			127,3	
	62,9			57,1			132,0			121,7	
3	62,0	63,5	11	62,3	60,3	3	134,6	131,4	11	124,7	131,4
	66,9			56,7			132,5			136,8	
	61,7			61,9			127,0			132,6	
4	52,5	60,3	12	61,4	58,8	4	123,0	123,8	12	125,0	132,3
	63,9			58,3			127,0			140,3	
	64,4			56,6			121,3			131,5	
5	56,8	57,9	13	56,2	59,1	5	133,9	132,7	13	136,8	128,8
	59,5			62,2			130,2			122,9	
	57,4			59			133,9			126,7	
6	65,1	65,6	14	56,5	56,3	6	123,1	123,4	14	120,1	120,9
	66,5			55			121,9			121,4	
	65,1			57,5			125,1			121,1	
7	56,8	57,4	15	60,8	61,8	7	125,5	133,3	15	130,3	123,3
	56,3			60,2			128,5			119,5	
	59,0			64,5			146,0			120,2	
8	59,2	58,5	Media	59,8	59,8	8	127,7	126,3	Media	127,8	127,8
	55,6		DE	3,426	2,541		124,3		DE	6,030	3,990
	60,8		CV	5,7 %	4,3 %		127,0		CV	4,7 %	3,1 %
Sesgo				1,0 %		Sesgo				-0,9 %	
Valor diana				59,2 µg/L		Valor diana				129 µg/L	
Intervalo				53,6 - 64,8		Intervalo				121 - 137	

DE: desviación estándar. CV: coeficiente de variación.

Para evaluar la precisión se calculó la imprecisión intermedia según la siguiente ecuación:

$$S_L = \sqrt{\left(\frac{n-1}{n}\right) \times S_r^2 + \frac{\sum_{d=1}^D (\bar{x}_d - \bar{\bar{x}}_D)^2}{D-1}}$$

La desviación estándar de las medias de cada día sumada cuadráticamente a la repetibilidad con un factor de ajuste (n-1)/n, corresponde a la imprecisión intermedia del laboratorio. La desviación estándar de las medias al cuadrado es el segundo sumando de la raíz antes indicada; y la variabilidad intraserie (S_r):

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D \sum_{i=1}^n (x_{di} - \bar{x}_d)^2}{D(n-1)}}$$

Donde:

- S_L : variabilidad intermedia.
- S_r : variabilidad intraserie.
- n: número de réplicas realizadas por día.
- D: número total de días.
- \bar{x}_d : media de los resultados de cada día.
- $\bar{\bar{x}}_D$: media de todos los resultados.
- x_{di} : valor de cada réplica.

En el caso del nivel 1, $S_r = 2,9 \mu\text{g/L}$; y del nivel 2, $S_r = 5,6 \mu\text{g/L}$. Por lo tanto, la imprecisión intermedia para el nivel 1 de control es $3,44 \mu\text{g/L}$; CV = 5,8%, y para el nivel 2 es $6,07 \mu\text{g/L}$; CV = 4,7%. Ambos valores de imprecisión intermedia son inferiores al

CV máximo deseable (6%) para el selenio plasmático, obtenido a partir de la variación biológica intra e interindividual (63,64).

Para evaluar la exactitud se calculó el sesgo según la ecuación:

$$\text{Sesgo} = 100 \times \frac{\text{valor medio} - \text{diana}}{\text{diana}}$$

La inexactitud o sesgo de la medida del nivel 1 de control fue 1%, y del nivel 2 de control -0,9%. Ambos resultados son muy inferiores a la inexactitud máxima deseable para el selenio plasmático (4,61%), obtenida a partir de los datos de variación biológica intra e interindividual (63,64).

Se calculó además el intervalo de confianza al 95% para la media de los 15 valores obtenidos utilizando la ecuación:

$$IC_{95\%} = x \pm t \frac{S_r}{\sqrt{N}} = x \pm 2,15 \frac{S_r}{\sqrt{15}}$$

Tabla 6-20. Comprobación de la exactitud del método

Parámetro	Nivel 1	Nivel 2
Valor diana	59,2	129,0
Intervalo de aceptabilidad	53,6 - 64,8	121 - 137
Media	59,8	127,8
S _r	2,9	5,6
Intervalo de confianza 95%	58,2 – 61,4	124,7 – 130,9

Los dos intervalos de confianza están dentro de los intervalos de aceptación de los controles, por lo que se consideró que el método cumplía con los criterios de exactitud.

6.2 Optimización de un método de determinación de selenio en suero en un equipo Perkin-Elmer

Se optimizó un método por absorción atómica en cámara electrotérmica en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 4100ZL, a partir del método de Julia Barciela (65), por el que se determinó el selenio sérico o plasmático del estudio de cohortes retrospectivo.

El programa de temperaturas inicial fue el de la tabla 5-21. La línea de resonancia empleada fue la de 196,0 nm. La fuente era una lámpara de descarga sin electrodos de selenio, operando a 240 mA. El ancho de rendija se fijó en 2,0 nm. Las lecturas se hicieron en área de pico. Se emplearon tubos de grafito pirolítico de calentamiento transversal con plataforma L'vov integrada convencionales y *end-capped*.

Tabla 6-21. Programa de temperaturas de partida

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo rampa (s)	Tiempo hold (s)	Flujo gas (L.min ⁻¹)	Lectura
1	110	10	25	*	No
2	130	5	30	*	No
3	1350	10	20	*	No
4	2200	0	5	*	Sí
5	2450	1	3	*	No

Se introducían en la cámara 40 µL de una dilución 1:4 de suero o plasma con modificador de matriz, nitrato de paladio 112,5 mg/L y Triton X-100 0,1%, y 5 µL de cloruro de hidroxilamina 1M para reducir el paladio. La elección de la concentración inicial de modificador fue tal que se inyectaban 4,5 µL de paladio en la cámara de grafito. Con esta dilución del suero no se conseguía buena precisión en las experimentaciones, y se aumentó la dilución hasta 1:7.

A medida que se realizaban determinaciones, se observaba la aparición de un residuo carbonáceo en el tubo de grafito que afectaba a la precisión por lo que se probaron dos modos de limpieza. Se comenzó inyectando peróxido de hidrógeno al 6% cada 12 medidas. Tras varias jornadas de trabajo, mostró no ser eficaz en la eliminación del

residuo. Se probó la inyección de ácido nítrico al 5% cada 10 – 12 determinaciones, con mejores resultados, y se usó este método en adelante.

Optimización de la temperatura de calcinación

Se probaron distintas temperaturas para el paso 3 entre 900 y 1600 °C (Tabla 5-22) y los mejores picos de absorbancia se obtuvieron a 1350 °C, más adelantados y estrechos que a 1300 °C.

Tabla 6-22. Optimización de la temperatura de calcinación.

Temperatura (°C)	Absorbancia media	CV
900	0,0401	13,1 %
1000	0,0267	10,0%
1100	0,0220	6,0 %
1200	0,0242	4,0 %
1300	0,0235	7,0 %
1350	0,0248	1,6 %
1400	0,0230	5,6 %
1500	0,0211	11,4 %
1600	0,0134	8,4 %

Optimización de la temperatura de atomización

Se probaron temperaturas de atomización entre 2000 y 2300 °C. A 2000 y 2100 °C los picos de absorción son achatados, mostrando que la atomización del selenio de las muestras es más lenta que a mayor temperatura. Se seleccionó la temperatura óptima de 2200 °C (Tabla 5-23).

Tabla 6-23. Optimización de la temperatura de atomización

Temperatura (°C)	Absorbancia media	CV
2000	0,0310	0,7 %
2100	0,0270	11,4%
2200	0,0248	1,6 %
2300	0,0123	9,2 %

Repetibilidad

Se prepararon 11 cubiletes con diluciones 1:7 de un pool de plasmas con modificador de matriz. Se midió selenio del contenido de cada cubilete por triplicado. Se programó un pinchazo de ácido nítrico al 5% cada 9 mediciones. Se calculó la absorbancia media, la desviación estándar y el CV de las réplicas y la desviación estándar y el CV de las medias (Tabla 5-24). Con los coeficientes de variación obtenidos, inferiores al 10%, se consideró que el método y la frecuencia de limpieza del tubo era adecuada.

Método de calibración

Se determinó el método de calibración para la determinación de selenio en las muestras de suero y plasma. En las Tablas 5-25 y 5-26 se recogen las diluciones preparadas para cada punto de los dos tipos de calibración.

Tabla 6-24. Repetibilidad de un pool de plasmas

Nº	Absorbancia			Media	CV (%)
1	0,0383	0,0345	0,0367	0,0365	5,1
2	0,0338	0,0368	0,0385	0,0363	6,5
3	0,0361	0,0379	0,0346	0,0362	4,6
4	0,0333	0,0367	0,0390	0,0363	7,9
5	0,0349	0,0359	0,0343	0,0350	2,3
6	0,0286	0,0308	0,0373	0,0322	14,0
7	0,0318	0,0357	0,0335	0,0337	5,8
8	0,0365	0,0359	0,0384	0,0370	3,5
9	0,0375	0,0388	0,0390	0,0384	2,1
10	0,0377	0,0389	0,0379	0,0382	1,7
11	0,0394	0,0343	0,0360	0,0365	7,1
Media	0,0360				
DE de las réplicas	0,0026			DE de las medias	0,0018
CV de las réplicas	7,08%			CV de las medias	5,03%

DE: desviación estándar. CV: coeficiente de variación.

Tabla 6-25. Preparación de mezclas para adición estándar

	V estándar* (μL)	V muestra (μL)	V H ₂ O (μL)	Modificador (μL)	[Se]** (μL.L ⁻¹)
Adición 0	0	100	180	420	0
Adición 1	25	100	155	420	50
Adición 2	50	100	130	420	100
Adición 3	75	100	105	420	150

V estándar*: volumen de estándar de selenio de 200 μg/L. Modificador: volumen de modificador de Pd(NO₃)₂ 187,5 mg/L y Tritón X-100 0,1% v/v. [Se]**: concentración de selenio tras multiplicar por el factor de dilución.

Tabla 6-26. Preparación de estándares para calibración acuosa

	V estándar* (μL)	V H ₂ O (μL)	Modificador (μL)	[Se]** (μL.L ⁻¹)
Punto 0	0	280	420	0
Punto 50	25	255	420	50
Punto 100	50	230	420	100
Punto 150	75	205	420	150

V estándar*: volumen de estándar de selenio de 200 μg/L. Modificador: volumen de modificador de Pd(NO₃)₂ 187,5 mg/L y Tritón X-100 0,1% v/v. [Se]**: concentración de selenio tras multiplicar por el factor de dilución.

Se realizaron sucesivamente una calibración acuosa, una adición estándar, nueva calibración acuosa y nueva adición estándar con un pool de plasmas. Las rectas de calibración obtenidas fueron las siguientes:

1ª calibración acuosa:

$$\text{Abs} = 0,0041 \cdot \text{Conc} + 0,0015$$

$$R^2 = 0,9966$$

1ª adición estándar:

$$\text{Abs} = 0,0042 \cdot \text{Conc} + 0,0192$$

$$R^2 = 0,9765$$

2ª calibración acuosa:

$$\text{Abs} = 0,0045 \cdot \text{Conc} + 0,0007$$

$$R^2 = 0,9898$$

2ª adición estándar:

$$\text{Abs} = 0,0045 \cdot \text{Conc} + 0,0268$$

$$R^2 = 0,9986$$

Se analizaron los datos mediante ANOVA de un factor y se obtuvo una significación $p = 0,860$. No hubo diferencia significativa entre las pendientes. Con este resultado se confirmó que se podía trabajar con calibración frente a estándares acuosos.

Límite de detección y límite de cuantificación

Se calcularon el límite de detección instrumental (LD) y el límite de cuantificación estimado (LQ), para lo que se midieron 11 blancos de reactivo. La media de absorbancia fue 0,0010, la desviación estándar 0,0013 y la pendiente de la recta de calibrado 0,0045 $\mu\text{g}^{-1}\text{L}$.

$$\text{LD} = \frac{3,3 \times \text{DE}}{\text{pendiente}} = \frac{3,3 \times 0,0013}{0,0045} = 0,95 \times \text{factor de dilución} = 6,7 \mu\text{g/L}$$

$$\text{LQ} = \frac{10 \times \text{DE}}{\text{pendiente}} = \frac{10 \times 0,0013}{0,0045} = 2,89 \times \text{factor de dilución} = 20,2 \mu\text{g/L}$$

Ausencia de efecto matriz

La ausencia de efecto matriz se comprobó en el experimento en el que se comparó la adición estándar con la calibración frente a estándares acuosos. Las pendientes de las rectas obtenidas por el método de adición estándar sobre varias mezclas de plasmas no

diferían significativamente de las derivadas de calibraciones acuosas, demostrando que no hay efecto matriz en el método desarrollado.

Exactitud y precisión

Para la evaluación simultánea de la exactitud y la precisión se analizó un control *Seronorm® Trace Elements Serum* nivel 2, por triplicado y con calibraciones diferentes, durante 14 días, siguiendo en la medida de lo posible las recomendaciones ISO. Antes de aplicar las fórmulas, se descartó la presencia de valores aberrantes.

Tabla 6-27. Evaluación de la precisión y la exactitud

Día	Seronorm (µg/L)	Media (µg/L)	Día	Seronorm (µg/L)	Media (µg/L)
1	111,1	107,7	8	110,1	108,3
	109,7			106,7	
	102,2			108,2	
2	104,3	105,9	9	102,1	105,2
	102,7			103,8	
	110,8			109,6	
3	107,8	104,1	10	101,4	103,8
	102,2			105,6	
	102,4			104,4	
4	107,4	106,1	11	96,6	103,2
	97,9			106,4	
	112,9			106,5	
5	117,3	112,3	12	104,3	111,2
	109,8			112,2	
	112,8			117,1	
6	102,5	108,1	13	110,4	108,1
	110,9			111,6	
	111,0			102,4	

7	105,6	106,8	14	104,3	106,9
	109,8			103,4	
	105,0			113,0	
Media (µg/L)				107,1	107,1
DE (µg/L)				4,71	2,78
CV				4,4%	2,6%
Sesgo				0,09%	
Valor diana (µg/L)				107	
Intervalo de aceptación (µg/L)				100 - 114	

DE: desviación estándar. CV: coeficiente de variación.

Para evaluar la precisión se calculó la imprecisión intermedia según la siguiente ecuación:

$$S_L = \sqrt{\left(\frac{n-1}{n}\right) \times S_r^2 + \frac{\sum_{d=1}^D (\bar{x}_d - \bar{\bar{x}}_D)^2}{D-1}}$$

La desviación estándar de las medias de cada día sumada cuadráticamente a la repetibilidad con un factor de ajuste (n-1)/n, corresponde a la imprecisión intermedia del laboratorio. La desviación estándar de las medias al cuadrado es el segundo sumando de la raíz antes indicada, y la variabilidad intraserie (S_r):

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D \sum_{i=1}^n (x_{di} - \bar{x}_d)^2}{D(n-1)}}$$

Donde:

- S_L : variabilidad intermedia.
- S_r : variabilidad intraserie.

- n: número de réplicas realizadas por día.
- D: número total de días.
- \bar{x}_d : media de los resultados de cada día.
- $\bar{\bar{x}}_D$: media de todos los resultados.
- x_{di} : valor de cada réplica.

El resultado de variabilidad intraserie fue $S_r = 4,66 \mu\text{g/L}$. Por lo tanto, la imprecisión intermedia fue $S_L = 4,71 \mu\text{g/L}$, $CV = 4,40 \%$. El valor obtenido es inferior al CV máximo deseable (6%) para el selenio plasmático, obtenido a partir de la variación biológica intra e interindividual (63,64).

Para evaluar la exactitud se calculó el sesgo según la ecuación:

$$\text{Sesgo} = 100 \times \frac{\text{valor medio} - \text{diana}}{\text{diana}}$$

La inexactitud o sesgo de la medida del control fue 0,09%, muy inferior a la inexactitud máxima deseable para el selenio plasmático (4,61%), calculada a partir de los datos de variación biológica intra e interindividual (63,64).

Se calculó también el intervalo de confianza al 95% para la media de los 14 valores obtenidos utilizando la ecuación:

$$\text{IC } 95\% = x \pm t \frac{S_r}{\sqrt{N}} = x \pm 2,15 \frac{S_r}{\sqrt{14}}$$

Tabla 6-28. Comprobación de la exactitud del método

Parámetro	Seronorm
-----------	----------

Valor diana	107
Intervalo de aceptación	100 - 114
Media	107,1
S_r	4,66
Intervalo de confianza 95%	104,4 – 109,7

El intervalo de confianza está dentro del intervalo de aceptación del control, por lo que se consideró que el método cumplía con los criterios de exactitud.

6.3 Valores de referencia de selenio en suero

Las 118 muestras seleccionadas correspondieron a 72 hombres y 46 mujeres, y a 54 menores y 64 mayores de 60 años. Se determinó la concentración de selenio por el método optimizado en el espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 4100ZL.

La concentración media de selenio en la población seleccionada (media \pm desviación estándar) fue $89,93 \pm 12,60$ $\mu\text{g/L}$. En hombres, la concentración fue: $91,10 \pm 12,11$ $\mu\text{g/L}$. En mujeres: $88,10 \pm 13,25$ $\mu\text{g/L}$. En ≤ 60 años: $90,96 \pm 11,66$ $\mu\text{g/L}$. En > 60 años: $89,07 \pm 13,37$ $\mu\text{g/L}$. Se descartó la presencia de *outliers* con el test de Dixon (66).

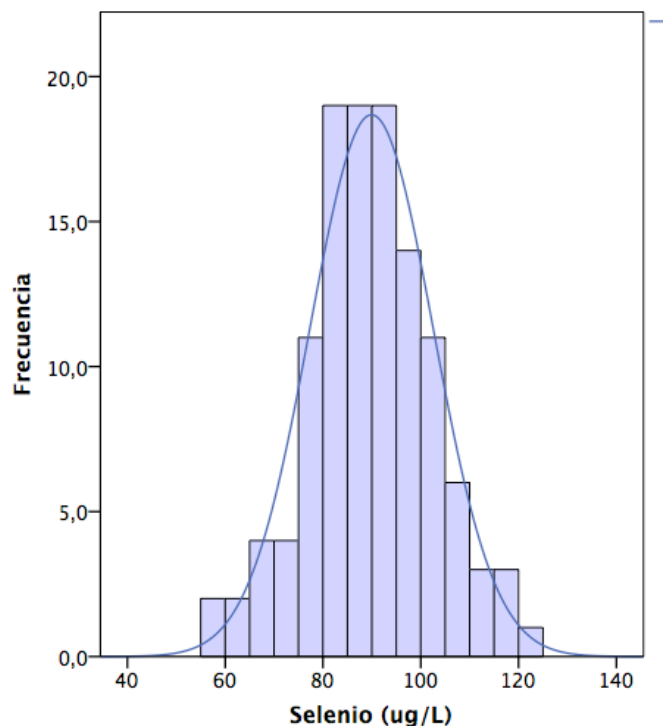


Figura 6-3. Selenio sérico de sujetos sanos

Se empleó el test Kolmogorov-Smirnov para comprobar que la distribución se ajustaba a la normalidad ($p = 0,200$).

El intervalo de referencia según el método no paramétrico basado en percentiles fue (66):

- Límite inferior (percentil 2,5): 63 $\mu\text{g/L}$ (IC 90% 59 - 69)
- Límite superior (percentil 97,5): 118 $\mu\text{g/L}$ (IC 90% 113 - 120)

6.3.1 Partición de valores de referencia

Se exploró la necesidad de intervalos de referencia segregados por sexo o rango de edad siguiendo el método de Harris y Boyd (67). Con subgrupos de, al menos, 40 sujetos, se puede estimar la significación estadística de la diferencia entre los valores medios de dos subgrupos mediante el test z:

$$z = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\left[\left(\frac{s_1^2}{n_1} \right) + \left(\frac{s_2^2}{n_2} \right) \right]^{1/2}}$$

donde \bar{x}_1 y \bar{x}_2 son los valores medios de los dos subgrupos, s_1 y s_2 sus varianzas y n_1 y n_2 el número de valores de cada subgrupo. El estadístico z calculado se compara con el valor “crítico”:

$$z^* = 3 \left(\frac{n_{media}}{120} \right)^{1/2} = 3[(n_1 + n_2)/240]^{1/2}$$

Para sendas parejas de subgrupos, se calculó un valor crítico $z^* = 2,10$.

El cociente de las desviaciones típicas obtenidas para cada una de las subclases fue inferior en los dos casos a 1,5 (sexo: 13,25/12,11; edad: 13,37/11,66).

$z_{\text{sexo}}=1,92$ y $z_{\text{edad}}=0,36$ fueron inferiores a $z^*=2,10$. No se justificó, por tanto, la obtención separada de intervalos de referencia por sexo o rango de edad.

No se halló diferencia significativa entre el selenio sérico de adultos menores y mayores de 60 años (prueba t: $p = 0,419$). No se halló diferencia significativa entre el selenio sérico de hombres y mujeres (prueba t: $p = 0,208$). Se exploró la correlación entre selenio sérico y edad, que no fue significativa (Rho de Spearman = -0,079, $p = 0,393$).

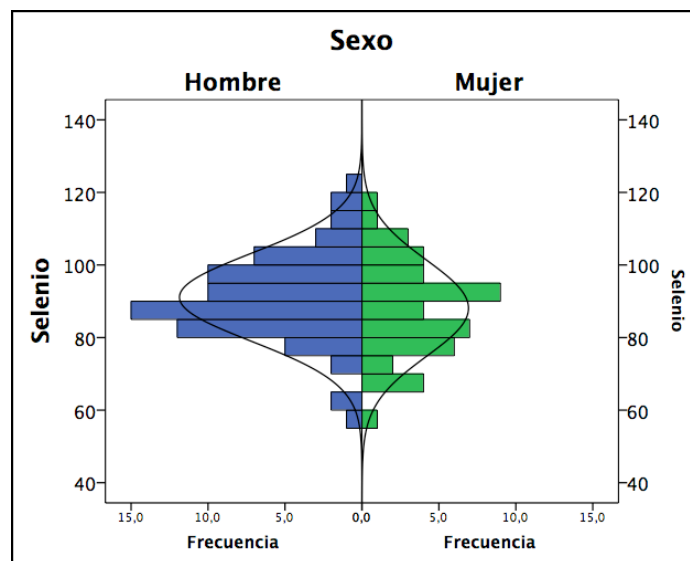


Figura 6-4. Selenio sérico de mujeres y hombres sanos del área geográfica

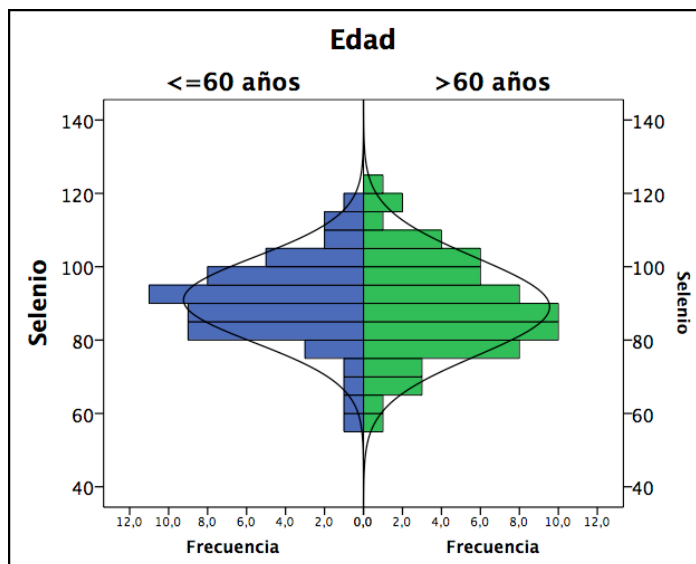


Figura 6-5. Selenio sérico de mayores y menores de 60 años del área geográfica

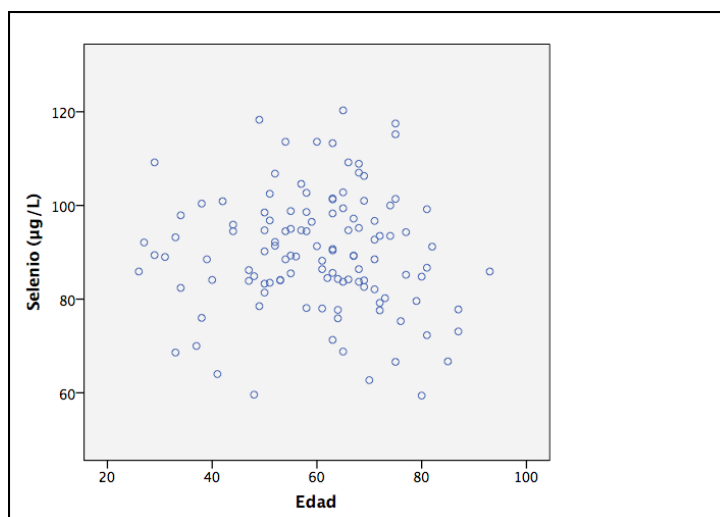


Figura 6-6. Diagrama de dispersión de selenio sérico y edad

6.4 Estudio preliminar de pacientes en diálisis peritoneal

El grupo control constó de 23 sujetos de entre 19 y 74 años, con una mediana de edad de 37. Once fueron mujeres (47,8%) y doce fueron hombres (52,2%).

El grupo de pacientes constó de 21 sujetos de entre 31 y 74 años, con una mediana de edad de 50; 9 mujeres (42,9%) y 12 hombres (57,1%).

Se determinó la concentración de selenio de las muestras por el método desarrollado en el espectrofotómetro de absorción atómica VARIAN SpectrAA-300. Tras cada calibración se analizaron controles. Se analizaron las muestras por tandas, en días distintos, intercalando muestras de pacientes entre muestras de sujetos sanos.

6.4.1 Comparación con grupo control

El grupo de sujetos sanos tuvo niveles séricos de selenio entre 70,2 y 148,9 $\mu\text{g/L}$, con mediana de 85,1 $\mu\text{g/L}$. El grupo de pacientes en diálisis peritoneal tuvo niveles de selenio entre 47,7 y 102,2 $\mu\text{g/L}$, con mediana de 74,5 $\mu\text{g/L}$ (Figura 5-7). Los resultados de ambos grupos se ajustaron a una distribución normal (Test de Kolmogorov-Smirnov, $p = 0,200$ en ambos grupos).

Se contrastó si los dos grupos procedían de una misma población con un test no paramétrico: la prueba U de Mann-Whitney. La hipótesis nula H_0 fue que no había diferencia entre los grupos y la hipótesis alternativa H_1 fue que había diferencia significativa entre los grupos.

U de Mann-Whitney fue igual a 118,0, $p = 0,004$. Se rechazó la hipótesis nula y se aceptó que había diferencia significativa entre las concentraciones de selenio de los dos grupos, con una seguridad del 99,6%.

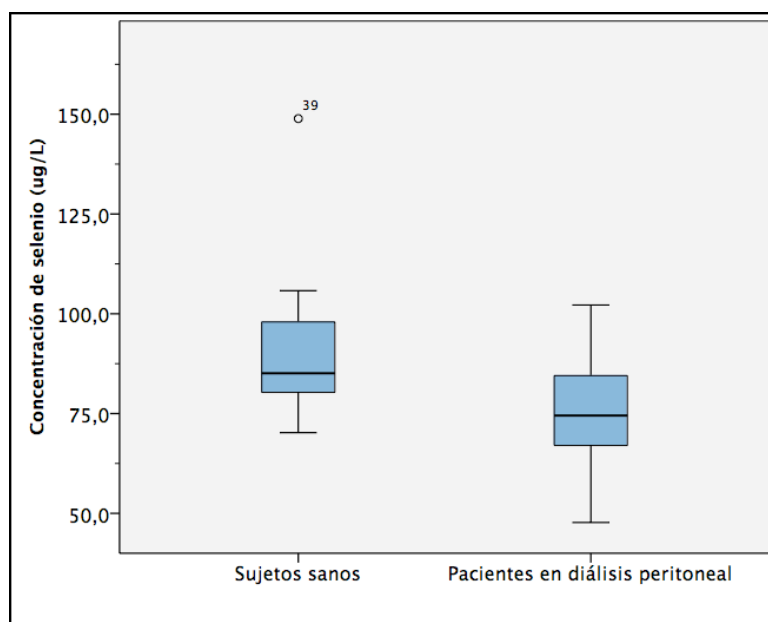


Figura 6-7. Concentración de selenio por grupos

6.4.2 Comparación con intervalo de referencia

Según el intervalo de referencia determinado en población adulta sana de la misma área sanitaria (63 – 118 $\mu\text{g/L}$), 1 sujeto del grupo de 23 controles tenía hiperselenemia (4,3%) y el resto normoselenemia. Del grupo de 21 pacientes, 18 tenían hiposelenemia (85,7%) y 3 normoselenemia.

6.5 Estudio observacional de cohortes retrospectivo

6.5.1 Descripción de la cohorte

La cohorte es de 102 pacientes con ERC, 62 hombres y 40 mujeres, con edades comprendidas entre los 23 y los 87 años (tabla 5-29). La edad mediana fue 62, con rango intercuartílico 53 – 75. La edad mediana (RIC) de los hombres fue 60 (52 – 71) años y la de las mujeres 65 (54 – 78) años.

Tabla 6-29. Edad y sexo de los sujetos de la cohorte

		Sexo	
		Hombre	Mujer
		Recuento	Recuento
Grupo de edad	<36 años	3	2
	36-55 años	19	10
	56-65 años	18	8
	66-75 años	10	7
	>75 años	12	13

39 pacientes eran no fumadores, 14 eran fumadores y 26 eran exfumadores. De 23 pacientes no se consiguieron datos acerca del hábito tabáquico.

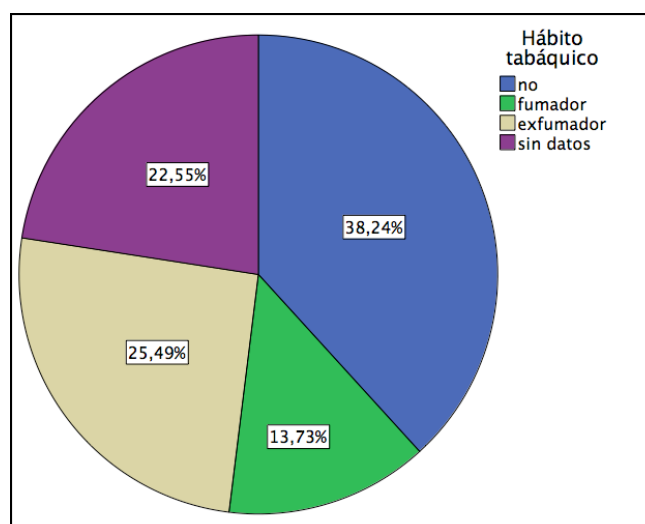


Figura 6-8. Hábito tabáquico

Las causas de la ERC de estos pacientes se agruparon en 6 categorías:

- Glomerulonefritis y otras causas autoinmunes (24 pacientes): vasculitis IgA, nefropatía lúpica, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis membranoproliferativa, granulomatosis con poliangitis y vasculitis asociada a P ANCA.
- Nefropatía diabética (20 pacientes).
- Nefropatía hipertensiva (17 pacientes).
- Enfermedad poliquística renal (7 pacientes).
- Causas post-renales (6 pacientes).
- Otras (13 pacientes): neoplasia renal, nefropatía intersticial crónica, hiperfiltración por riñón único, amiloidosis, pielonefritis xantogranulomatosa, síndrome de Alport, síndrome cardio-renal y enfermedad ateroembólica.

La causa de la enfermedad no estaba filiada en 10 pacientes.

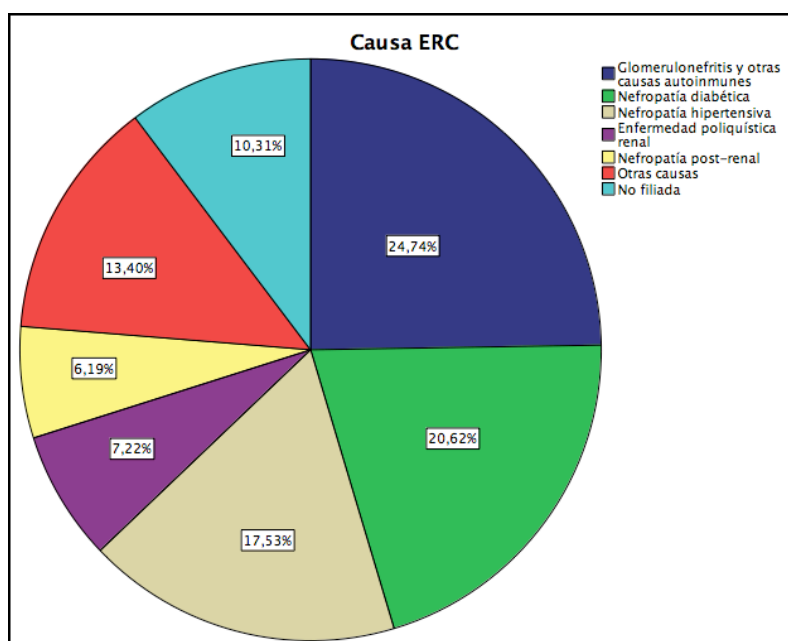


Figura 6-9. Causa de ERC

17 pacientes estaban en situación de prediálisis y 85 llevaban con alguna modalidad de diálisis entre <1 y 269 meses, media $40,4 \pm 50,5$ meses y mediana 22.

Tabla 6-30. Modalidad de diálisis

	Nº de pacientes	Porcentaje (%)
Hemodiálisis convencional	48	47,1

Hemodiafiltración	26	25,5
Diálisis peritoneal	11	10,8
ERC sin diálisis	17	16,7
Total	102	100,0

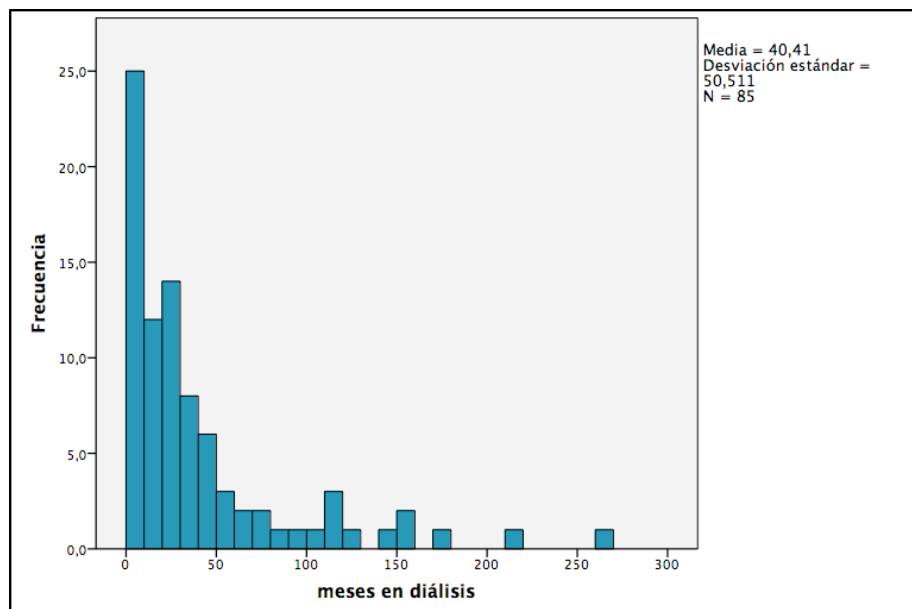


Figura 6-10. Meses en diálisis

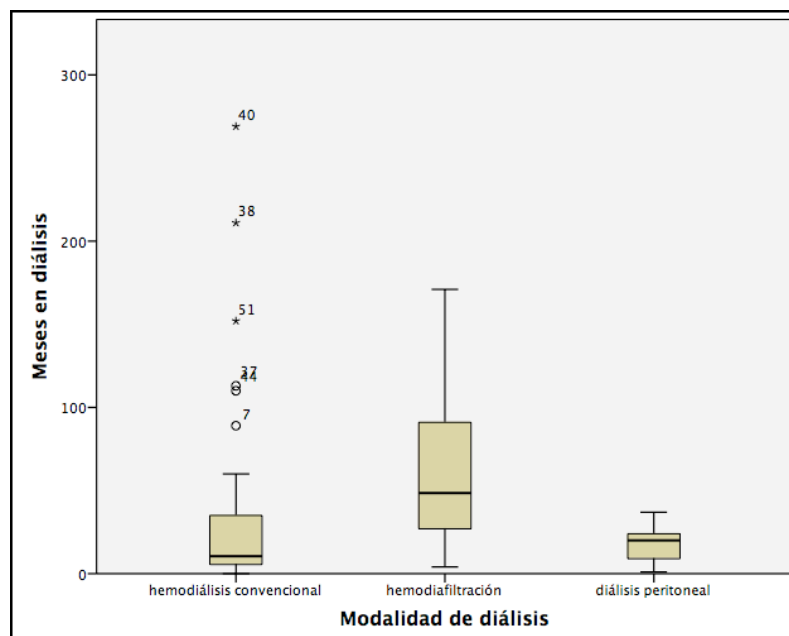


Figura 6-11. Meses en diálisis por modalidad

Variables epidemiológicas

68 pacientes tenían historia de hipertensión arterial (66,7%), 3 de ellos con hipertensión resistente.

32 pacientes (31,4%) eran diabéticos.

45 pacientes (44,1%) tenían antecedentes de enfermedad cardiovascular (insuficiencia cardíaca, cardiopatía isquémica, enfermedad vascular periférica y/o enfermedad cerebrovascular). 11 con historia de insuficiencia cardíaca, 23 de cardiopatía isquémica, 23 de arteriopatía periférica y 13 de enfermedad cerebrovascular. 52 pacientes tenían imágenes compatibles con miocardiopatía hipertrófica por ecocardiografía, y 19 pacientes miocardiopatía dilatada por la misma técnica de imagen.

11 pacientes (10,8%) tenían antecedentes de patología tiroidea: 5 hipertiroidismo y 6 hipotiroidismo.

De los 62 pacientes varones, 9 (14,5%) tenían historia de patología prostática, 6 benigna y 3 maligna.

20 pacientes (19,6%) tenían historia de enfermedad oncológica (Tabla 5-31).

Tabla 6-31. Localización cáncer

Sistema afectado	Nº de pacientes
Hematológico	2
Nefrourológico	9
Ginecológico	3
Próstata	3
Digestivo	2
Tiroides	2
Labio	1
Enfermedad de Von Hippel-Lindau	1

Con respecto al uso de estatinas, se tienen datos de 94 pacientes. 37 pacientes (39,3%) estaban en tratamiento crónico (> 6 meses) con alguna de las 4 estatinas: atorvastatina, pravastatina, simvastatina y fluvastatina. A 1 paciente se le había

suspendido el tratamiento en los meses anteriores y 1 paciente comenzó el tratamiento en la época de realización de la analítica.

Variables analíticas

Los resultados globales de las variables medidas en la analítica de sangre son los recogidos en las tablas 5-32 y 5-33.

Tabla 6-32. Variables analíticas de distribución normal de la cohorte

Variable	N	Media	DE	Mínimo	Máximo
Calcio (mg/dL)	102	9,38	0,666	7,4	11,6
Creatinina (mg/dL)	102	7,10	2,859	1,71	16,75
Hemoglobina (g/dL)	101	12,09	1,472	6,6	16,4
K (mmol/L)	102	4,89	0,699	2,9	7,2
Fosfato (mg/dL)	101	4,31	1,140	1,8	7,8
Prealbúmina (mg/dL)	10	34,39	7,464	22,5	44,7
Urea (mg/dL)	100	120,98	37,908	39	267

Tabla 6-33. Variables analíticas de distribución no normal de la cohorte

Variable	N	Mediana	RIC	Mínimo	Máximo
Albúmina (g/dL)	100	4,0	3,7 – 4,2	2,0	4,7
Colesterol (mg/dL)	99	163	139 - 188	93	332
Hierro (µg/dL)	96	58	46 - 73	28	129
Na (mmol/L)	102	139	137 - 141	123	146
Proteína C reactiva (mg/L)	89	6,2	2,8 – 12,3	0,7	330,6
Proteínas totales (g/dL)	101	6,8	6,4 – 7,2	3,9	8,3
PTH (pg/mL)	76	291	144 - 419	31	1572
Selenio (µg/L)	102	61,6	49,4 – 71,0	24,9	186,6

Triglicéridos (mg/dL)	65	122	80 - 174	7	385
Urato (mg/dL)	101	6,0	5,1 – 6,7	3,0	10,0

Supervivencia a los cinco años desde la analítica

La mediana de seguimiento de la cohorte de pacientes fue de 72 meses (IC 95% 71,8 – 72,2).

Entre la analítica, realizada entre mayo de 2010 y mayo de 2011, y mayo de 2016, fallecieron 49 de 101 pacientes de la cohorte (48,5%), 22 mujeres y 27 hombres. Hubo un paciente perdido en el seguimiento. La edad media de estos pacientes fue $70,6 \pm 10,2$ años, mediana 71 años, rango 44 – 86.

El porcentaje acumulado de fallecimientos fue del 20% a los 12 meses, del 25% a los 24 meses, del 31% a los 36 meses, del 45% a los 48 meses y del 57% a los 60 meses. La curva de supervivencia se muestra en la figura 5-12. La media estimada de supervivencia es de 53,6 meses, IC 95%: 48,6 – 58,6 meses.

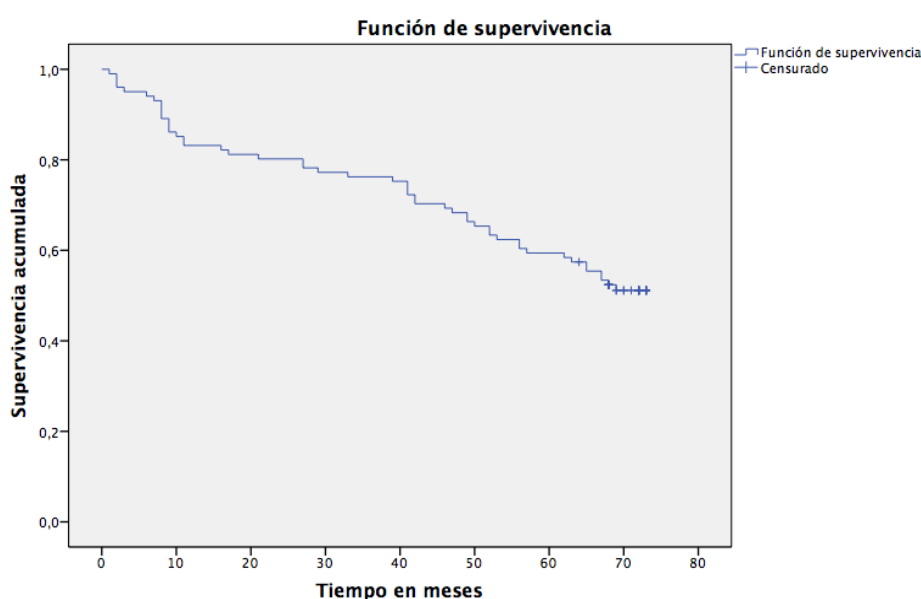


Figura 6-12. Curva de Kaplan-Meier global de la cohorte

7 de los pacientes fallecidos no habían comenzado tratamiento sustitutivo en el momento del análisis (prediálisis o estadio 4). 29 pacientes estaban en tratamiento sustitutivo con hemodiálisis convencional y 13 pacientes con hemodiafiltración *on line*. No hubo fallecidos entre los que se trataban con diálisis peritoneal.

Entre las causas del fallecimiento descritas se encuentra la enfermedad cardiovascular (12 pacientes), infección (8 pacientes) y cáncer (2 pacientes). No tuvimos datos de la causa de muerte de 16 pacientes.

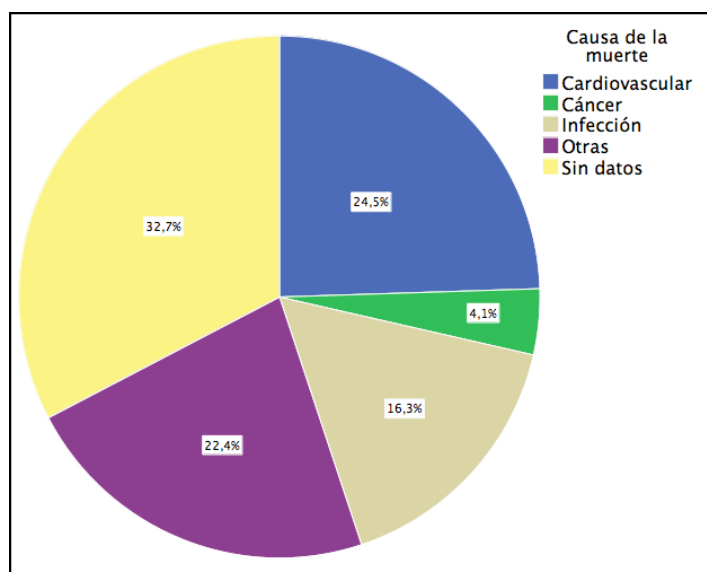


Figura 6-13. Causa del fallecimiento

6.5.2 Selenio plasmático en la cohorte de pacientes

El selenio plasmático medio de los 102 pacientes fue $63,03 \pm 22,09$ $\mu\text{g/L}$, con mediana 61,6 $\mu\text{g/L}$, mínimo 24,9, máximo 186,6 y rango intercuartílico 49,4 – 71,0.

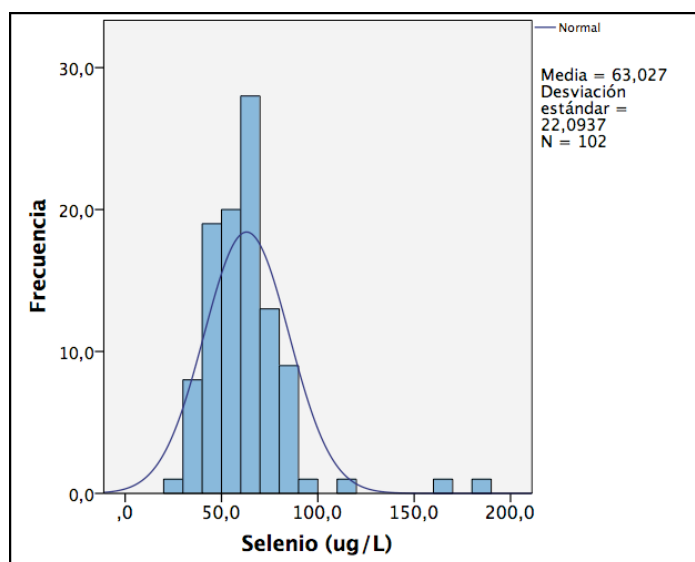


Figura 6-14. Selenio plasmático en la cohorte de pacientes

Mediante el test Kolmogorov-Smirnov, con corrección de la significación de Lilliefors, se comprobó que la concentración plasmática de selenio en los pacientes se aleja de la normal, con una significación $p = 0,001$.

Comparación con sujetos sanos

Se compararon los valores de selenio plasmático de los pacientes con el grupo de sujetos sanos mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. La hipótesis nula H_0 fue que no había diferencia entre los grupos y la hipótesis alternativa H_1 fue que había diferencia significativa entre los grupos.

U de Mann-Whitney fue igual a 1015,0, $p = 0,000$. Se rechazó la hipótesis nula y se aceptó que había diferencia significativa entre las concentraciones de selenio de los dos grupos.

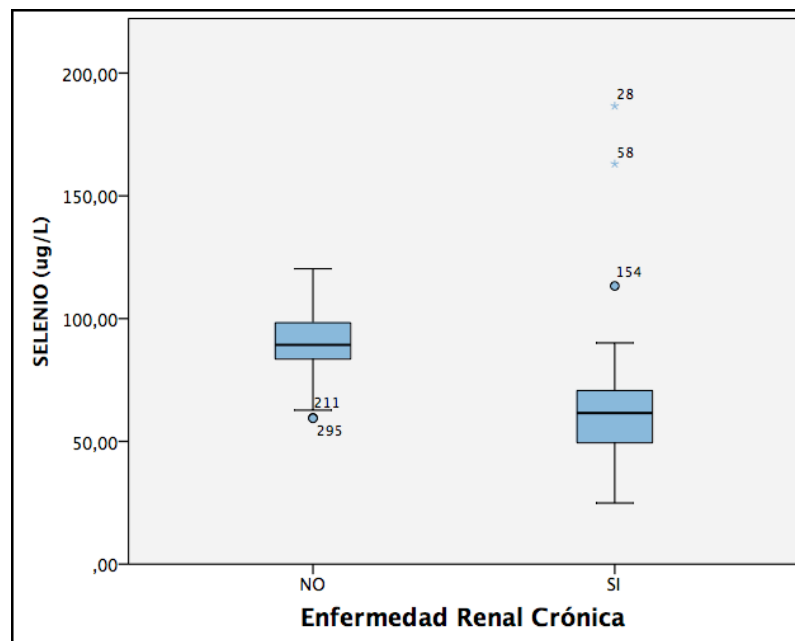


Figura 6-15. Selenio plasmático en sujetos con y sin enfermedad renal crónica

Comparación con intervalo de referencia en población sana

Según el intervalo de referencia determinado en población adulta sana de la misma área sanitaria (63 – 118 µg/L), 53 pacientes de la cohorte tenían hiposelenemia (52,0%), 47 tenían normoselenemia (46,1%) y 2 hiperselenemia (2,0%).

6.5.3 Selenio y mortalidad

Análisis global de la cohorte

Se agruparon los pacientes según tuvieran hiposelenemia o no en la primera analítica. 35 de los 53 pacientes con hiposelenemia fallecieron, así como 14 de los pacientes con selenemia normal o alta. La supervivencia media estimada por el método de Kaplan-Meier fue de 46,2 meses para los pacientes con hiposelenemia (IC 95% 39,2 – 53,3 meses) y de 61,8 meses para el resto (IC 95% 55,6 – 68,0 meses). El test Log Rank mostró diferencia estadísticamente significativa entre las distribuciones de supervivencia de ambos grupos ($p = 0,000$).

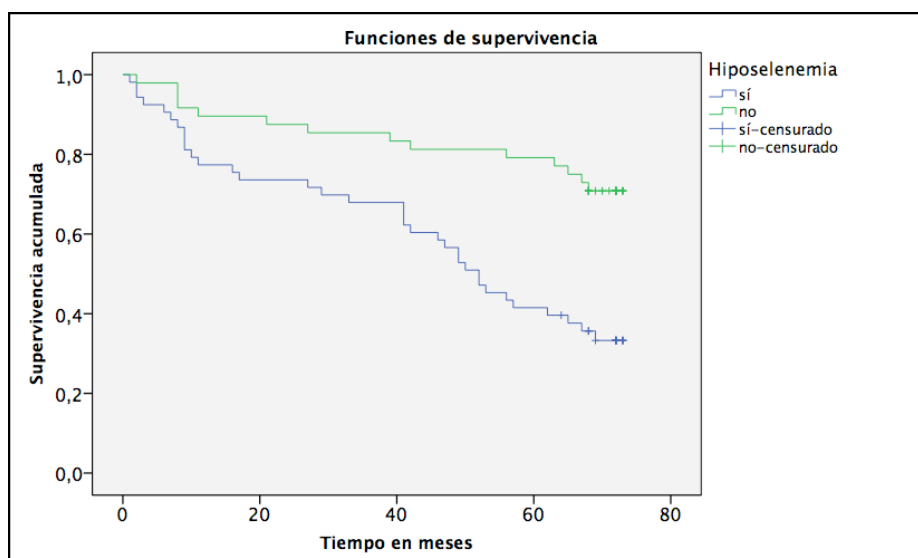


Figura 6-16. Curva de Kaplan-Meier según existencia de hiposelenemia en la primera analítica

Las características, en el momento del análisis, de los pacientes estratificados por hiposelenemia se recogen en la Tabla 5-34.

Mediante regresión de Cox, se estimó el *Hazard Ratio* (HR) de mortalidad por cualquier causa corregido por edad y sexo para los sujetos con hiposelenemia (modelo 1). El sexo no modificó de manera significativa el HR por lo que se eliminó del modelo (modelo 2). Los resultados se muestran en la Tabla 5-35.

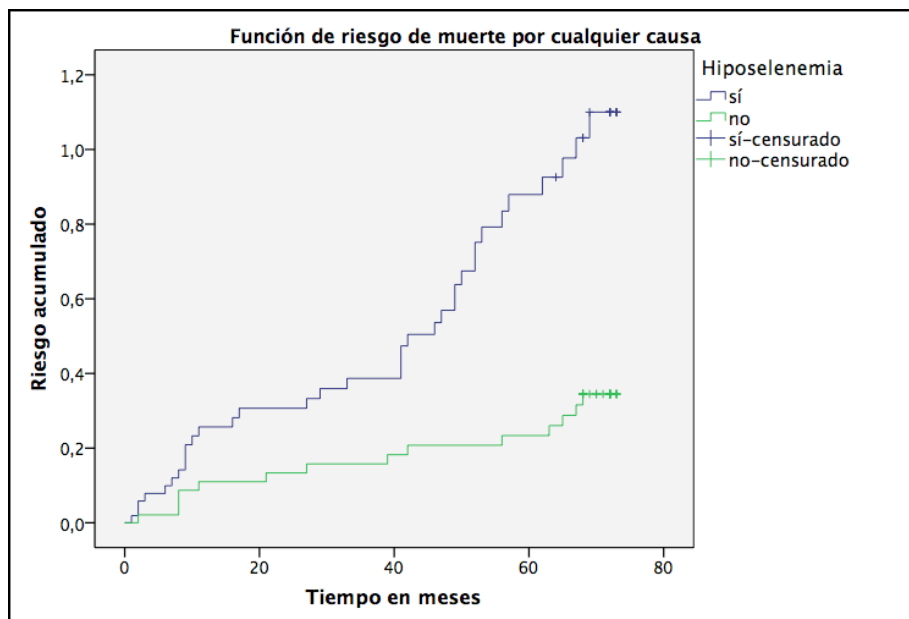


Figura 6-17. Curvas de mortalidad estimadas por Kaplan-Meier según existencia de hiposenemia en la primera analítica

Tabla 6-34. Características basales de los pacientes estratificados por hiposenemia

		Hiposenemia		p
		Sí	No	
N		53	49	
Selenio (µg/L)	Mediana (RIC)	49,6 (43,6 – 56,6)	71,8 (66,7 – 81,3)	
Edad	Media ± DE	62,5 ± 13,9	61,8 ± 15,5	0,801
Sexo (%)	masculino	58,5	63,3	0,622
Díálisis (%)	N = 102	92,5	73,5	0,010
DM (%)	N = 97	41,2	23,9	0,071
Historia de cardiopatía isquémica (%)	N = 97	33,3	13,0	0,019
Historia de enfermedad cardiovascular (%)	N = 97	56,9	34,8	0,029

Historia de cáncer (%)	N = 95	24,0	17,8	0,458
Fumador o exfumador (%)	N = 79	53,5	47,2	0,579

Tabla 6-35. Hazard ratios para mortalidad por cualquier causa con hiposelenemia

	HR	IC 95%	p
Modelo 1	3,488	1,848 – 6,586	0,000
Modelo 2	3,478	1,844 – 6,563	0,000
Modelo 3	2,585	1,324 – 5,048	0,005

Se ajustó el modelo por análisis multivariado (modelo 3). Para una preselección de covariables, se realizaron análisis univariados mediante regresión de Cox de las variables epidemiológicas potencialmente relacionadas con la mortalidad, ajustadas por edad. El motivo es que el número de eventos (fallecimientos) es de 49, por lo que el número máximo recomendable de covariables a evaluar mediante regresión de Cox es de 5, para obtener una relación entre eventos y covariables de 10:1. Se seleccionaron la edad, tratamiento con diálisis, historia de cardiopatía isquémica e historia de enfermedad vascular periférica. Para identificar las variables significativas se empleó la estrategia condicional “hacia atrás”.

Tabla 6-36. Hazard ratios ajustados por edad mediante análisis univariado y multivariado (modelo 3)

	Univariado		Multivariado (modelo 3)	
	HR	p	HR	p
Edad			1,102 (1,065 – 1,142)	0,000
Diálisis	5,249 (2,139 – 12,880)	0,000	3,872 (1,262 – 11,873)	0,018

DM	1,413 (0,785 – 2,542)	0,248	-	-
Hábito tabáquico				
(fumador/exfumador vs. nunca)	1,090 (0,564 – 2,109)	0,797	-	-
HTA resistente	0,377 (0,052 – 2,738)	0,335	-	-
Hª de cardiopatía isquémica	2,520 (1,378 – 4,609)	0,003	1,838 (1,009 – 3,349)	0,047
Enfermedad vascular periférica	2,164 (1,172 – 3,994)	0,014	1,497 (0,789 – 2,839)	0,217
Enfermedad cerebrovascular	1,742 (0,858 – 3,535)	0,124	-	-
Insuficiencia cardíaca	1,242 (0,570 – 2,706)	0,586	-	-
Hª de neoplasia	1,489 (0,767 – 2,888)	0,239	-	-

Según el modelo 3, son variables modificadoras de la mortalidad la edad, estar en tratamiento con diálisis (es decir, estadio 5 vs. estadio 4 de ERC), la hiposelenemia y tener historia previa de cardiopatía isquémica. La variable Historia de enfermedad vascular periférica fue eliminada del modelo en el paso 2.

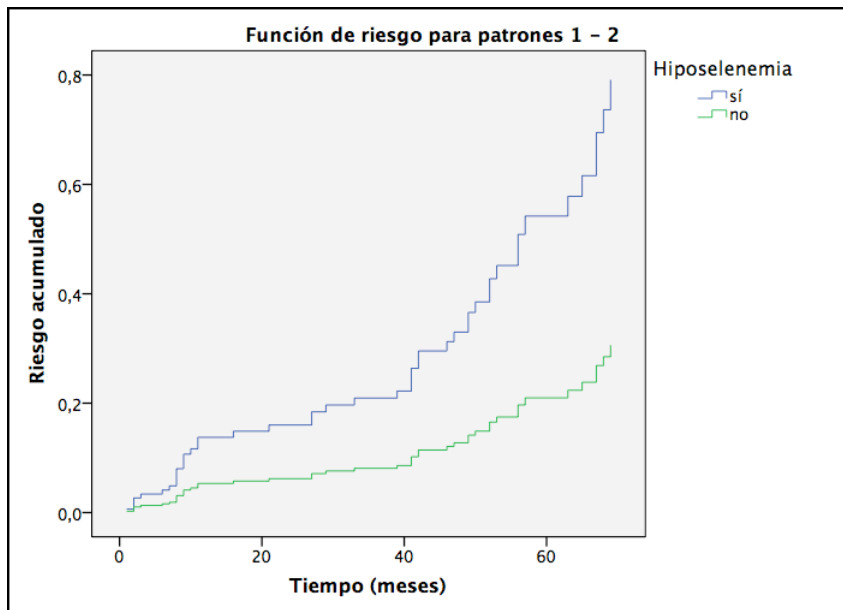


Figura 6-18. Función de riesgo de mortalidad por cualquier causa en la media de covariables con y sin hiposelenemia (modelo 3)

Verificación del modelo

Para verificar el cumplimiento del criterio de proporcionalidad de los riesgos, se computó la covariable hiposelenemia como estrato y se representó gráficamente el logaritmo de la función de riesgo acumulado frente al tiempo (gráfico “log menos log”). Las curvas no se cruzan, apoyando que se cumple el criterio de riesgos proporcionales para el uso de la regresión de Cox (Figura 5-19) (68).

Para estimar la bondad de ajuste del modelo, se calculó el valor predicho del predictor lineal (combinación lineal de los predictores corregidos de los valores de referencia por los coeficientes de regresión: $X \cdot \text{Beta}$ en el programa SPSS) o PI (*prognostic index*) para cada sujeto de la cohorte. Se construyeron 3 grupos de riesgo categorizando los PI en tertiles. Esta nueva variable se añadió al modelo, y se valoró si el logaritmo de la verosimilitud mejoraba con la inclusión. Una mejora significativa indicaría que las covariables incluidas en el modelo son insuficientes para los datos de la cohorte (69).

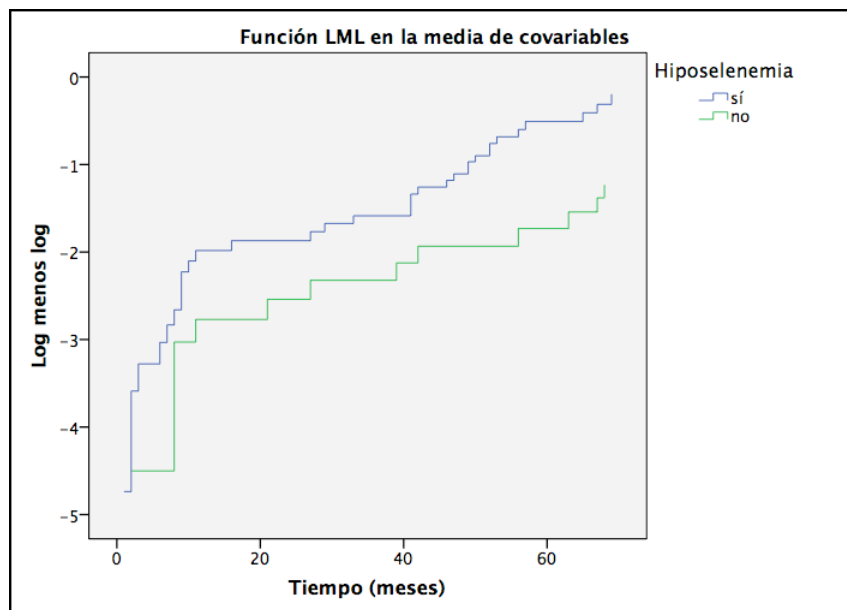


Figura 6-19. Representación del logaritmo de la función de riesgo acumulado en cada estrato frente al tiempo (verificación modelo 3)

Tabla 6-37. Cálculo de los coeficientes del modelo con la variable de grupos de riesgo categorizados en tertiles para la estimación de la bondad de ajuste (modelo 3)

Pruebas ómnibus de coeficientes de modelo^c

Paso	Logaritmo de la verosimilitud -2	Global (puntuación)			Cambio respecto a paso anterior			Cambio respecto a bloque anterior		
		Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.
1 ^a	330,214	58,249	6	0,000	63,524	6	0,000	63,524	6	0,000
2 ^b	332,050	54,426	4	0,000	1,837	2	0,399	61,688	4	0,000

a. Variables entradas en el número de paso 1: Edad dialisis_dicotomica H^acardiopatiaisquemica

Hiposelenemia Tertilderiesgo

b. Variable eliminada en el número de paso 2: Tertilderiesgo

c. Número de bloque de inicio 1. Método = Retroceder por paso (LR condicional)

Tabla 6-38. Estimación de la pérdida de χ^2 con la eliminación de variables del modelo 3 en la regresión de Cox condicional “hacia atrás”

Modelo si se elimina el término

Término eliminado		Pérdida de chi-cuadrado	gl	Sig.
Paso 1	Edad	16,766	1	0,000
	dialisis_dicotomica	8,643	1	0,003
	H ^a cardiopatiaisquemica	5,645	1	0,018
	Hiposelenemia	9,446	1	0,002

Paso 2	Tertileriesgo	1,839	2	0,399
	Edad	39,528	1	0,000
	dialisis_dicotomica	7,348	1	0,007
	Hªcardiopatiaisquemica	3,828	1	0,050
	Hiposenemia	8,600	1	0,003

La mejora resultó no significativa ($p = 0,399$) y la variable tertil de riesgo se eliminó del modelo. Se concluye que el modelo 3 tiene una bondad de ajuste global a los datos adecuada.

Análisis en subgrupo de pacientes en tratamiento sustitutivo

Se estratificó la cohorte en dos grupos, según estuvieran en tratamiento sustitutivo o no en el momento de la medición de selenio, y se estimó la supervivencia media por el método de Kaplan-Meier con el factor hiposenemia. El test Log Rank mostró diferencia estadísticamente significativa entre las distribuciones de supervivencia para los dos grupos de selenemia ajustados para el tratamiento sustitutivo ($p = 0,000$).

La supervivencia media estimada fue de 45,4 meses para los pacientes en diálisis con hiposenemia (IC 95% 38,0 – 52,8 meses) y de 59,8 meses para los pacientes con normo o hiperselenemia (IC 95% 51,9 – 67,8 meses). Las supervivencias medias estimadas en el grupo de pacientes en prediálisis fueron 55,7 meses con hiposenemia (IC 95% 33,5 – 78,0 meses) y 67,1 meses con normo o hiperselenemia (IC 95% 62,0 – 72,5 meses).

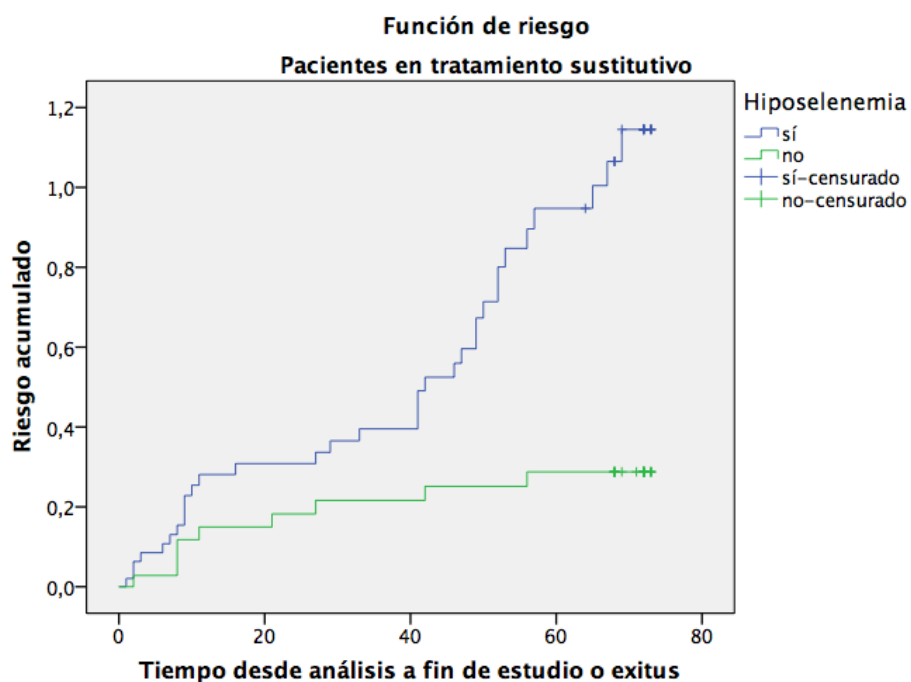


Figura 6-20. Curvas de mortalidad estimadas por Kaplan-Meier según existencia de hiposenemia en los pacientes en tratamiento sustitutivo

Se seleccionó la subcohorte de pacientes en diálisis para los siguientes análisis. En mayo de 2016 habían fallecido 33 de 49 pacientes con hiposenemia (67,3%) y 9 de 36 pacientes con normo o hiperselenemia (25%). Las características basales de los pacientes se muestran en la tabla 5-39.

Tabla 6-39. Características basales de la subcohorte de tratamiento sustitutivo con y sin hiposenemia

		Hiposenemia		p
		Sí	No	
N		49	36	
Selenio (µg/L)	Mediana (RIC)	49,6 (43,6 – 56,6)	69,8 (65,6 – 77,8)	
Edad	Media ± DE	61,6 ± 13,5	58,8 ± 14,7	0,368
Sexo (%)	masculino	59,2	66,7	0,482

Modalidad de diálisis (%)	N = 85			0,017
	Hemodiálisis convencional	63,3	47,2	>0,05
	Hemodiafiltración on line	32,7	27,8	>0,05
	Diálisis peritoneal	4,1	12,9	>0,05
DM (%)	N = 85	42,9	25,0	0,089
Historia de cardiopatía isquémica (%)	N = 85	32,7	16,7	0,096
Historia de enfermedad cardiovascular (%)	N = 85	57,1	36,1	0,055
Historia de cáncer (%)	N = 83	25,0	17,1	0,391
Fumador o exfumador (%)	N = 68	51,2	51,9	0,959

Mediante regresión de Cox, se estimó el *Hazard Ratio* (HR) de mortalidad por cualquier causa corregido por edad para los sujetos con hiposelenemia comparados con los pacientes con normo o hiperselenemia, tras comprobar que el sexo no era covariable significativa. El resultado fue HR = 3,031 (1,443 – 6,367) (modelo A).

Para un ajuste multivariado del *hazard ratio*, se preseleccionaron las potenciales covariables mediante análisis univariados ajustados por edad por regresión de Cox. Se encontraron HR incrementados y significativos con historia de cardiopatía isquémica, de enfermedad vascular periférica y de enfermedad cerebrovascular (Tabla 5-40). Como son más covariables que el número de fallecimientos en la subcohorte nos permite evaluar, se empleó la covariable “Historia de enfermedad cardiovascular”, que engloba las variables cardiopatía isquémica, enfermedad vascular periférica, enfermedad cerebrovascular e insuficiencia cardíaca.

No fue posible determinar HR para la modalidad de diálisis, probablemente debido a la ausencia de fallecimientos en el periodo de estudio en el grupo que recibía diálisis peritoneal. El pequeño número de sujetos con criterios de HTA resistente resultó

en un intervalo de confianza para el HR calculado demasiado amplio para ser tenido en cuenta.

Tabla 6-40. Hazard ratios ajustados por edad mediante análisis univariado y multivariado (modelo B)

	Univariado		Multivariado (modelo B)	
	HR	p	HR	p
Edad			1,106 (1,066 – 1,147)	0,000
Modalidad de diálisis	Coefficientes no convergen	-	-	-
DM	1,218 (0,659 – 2,251)	0,529	-	-
Hábito tabáquico (fumador/exfumador vs. nunca)	0,817 (0,410 – 1,630)	0,567	-	-
HTA resistente	Casos insuficientes	-	-	-
Hª de enfermedad cardiovascular	2,543 (1,285 – 5,033)	0,007	2,431 (1,237 – 4,778)	0,010
Hª de cardiopatía isquémica	2,060 (1,079 – 3,932)	0,028	-	-
Hª de enfermedad vascular periférica	2,074 (1,106 – 3,891)	0,023	-	-
Hª de enfermedad cerebrovascular	2,376 (1,109 – 5,090)	0,026	-	-
Hª de insuficiencia cardíaca	1,806 (0,793 – 4,112)	0,159	-	-
Hª de neoplasia	1,213 (0,601 – 2,446)	0,590	-	-

Según el modelo B, obtenido por análisis multivariado por regresión de Cox condicional “hacia atrás”, la existencia de hiposelenemia modifica significativamente el riesgo de mortalidad por cualquier causa, ajustado por edad e historia de enfermedad cardiovascular: HR = 2,952 (1,402 – 6,217), $p = 0,004$.

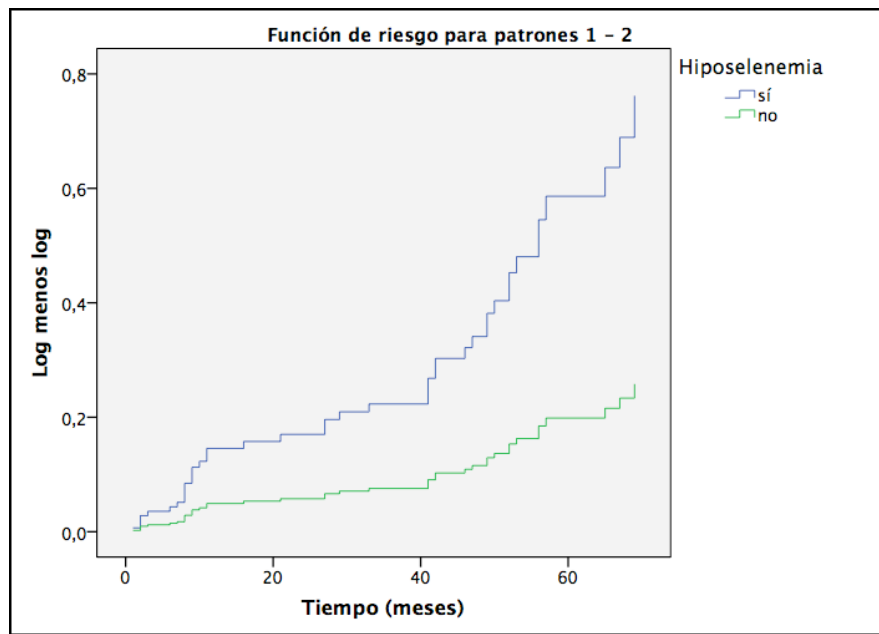


Figura 6-21. Función de riesgo de mortalidad por cualquier causa en la media de covariables con y sin hiposelenemia (modelo B).

Verificación del modelo

Para verificar el cumplimiento del criterio de proporcionalidad de los riesgos, se computó la covariable hiposelenemia como estrato y se representó gráficamente el logaritmo de la función de riesgo acumulado frente al tiempo (gráfico “log menos log”). Las curvas no se cruzan, verificándose así el cumplimiento del criterio de riesgos proporcionales (Figura 5-22).

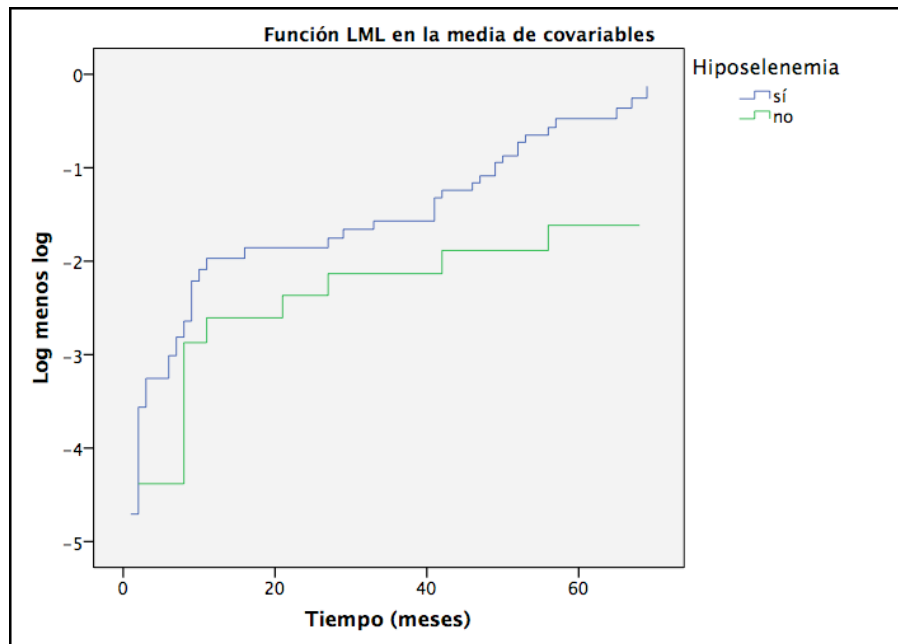


Figura 6-22. Representación del logaritmo de la función de riesgo acumulado en cada estrato frente al tiempo (verificación modelo B)

Para estimar la bondad de ajuste del modelo, se calculó el PI para cada sujeto de la cohorte y se crearon 3 grupos de riesgo categorizándolos en tertiles. Esta nueva variable se añadió al modelo, y se valoró si el logaritmo de la verosimilitud mejoraba con la inclusión.

Tabla 6-41. Cálculo de los coeficientes del modelo con la variable de grupos de riesgo categorizados en tertiles para la estimación de la bondad de ajuste (modelo B)

Pruebas ómnibus de coeficientes de modelo ^c										
Paso	Logaritmo de la verosimilitud -2	Global (puntuación)			Cambio respecto a paso anterior			Cambio respecto a bloque anterior		
		Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.
1 ^a	285,700	55,598	4	0,000	62,721	4	0,000	62,721	4	0,000
2 ^b	286,277	49,254	3	0,000	0,577	1	0,447	62,144	3	0,000

a. Variables entradas en el número de paso 1: Edad Enfermedad_cardiovascular Hiposelenemia

Tertil_de_riesgo_modelo_b

b. Variable eliminada en el número de paso 2: Tertil_de_riesgo_modelo_b

c. Número de bloque de inicio 1. Método = Retroceder por paso (LR condicional)

Tabla 6-42. Estimación de la pérdida de χ^2 con la eliminación de variables del modelo B en la regresión de Cox condicional “hacia atrás”

Modelo si se elimina el término				
Término eliminado		Pérdida de chi-cuadrado	gl	Sig.
Paso 1	Edad	5,321	1	0,021
	Enfermedad_cardiovascular	3,478	1	0,062
	Hiposelenemia	4,455	1	0,035
	Tertil_de_riesgo_modelo_b	0,578	1	0,447
Paso 2	Edad	37,540	1	0,000
	Enfermedad_cardiovascular	7,319	1	0,007
	Hiposelenemia	9,616	1	0,002

La mejora resultó no significativa ($p = 0,447$) y la variable tertil de riesgo se eliminó del modelo. Se concluye que el modelo B tiene una bondad de ajuste global a los datos adecuada.

6.5.4 Selenio y tratamiento crónico con estatinas

Para el análisis de la relación entre los niveles de selenio plasmático y el tratamiento crónico con estatinas se seleccionaron los 94 pacientes de los que se tenían datos de prescripción farmacológica. Se excluyeron dos casos, uno por suspensión del tratamiento con estatina en los meses anteriores a la realización de la analítica y otro por prescripción de estatina en la misma época. Los 92 casos restantes se agruparon en tratamiento crónico (37 pacientes) y no tratamiento (55 pacientes).

Comparación entre grupos mediante prueba de Mann-Whitney

Los pacientes en tratamiento tuvieron una mediana de selenio plasmático de 65,2 $\mu\text{g/L}$, con RIC = 55,8 – 77,5 $\mu\text{g/L}$. Los pacientes que no estaban en tratamiento con estatinas tuvieron una mediana de selenio de 57,0 $\mu\text{g/L}$, con RIC = 46,3 – 68,8 $\mu\text{g/L}$.

En la comparación entre grupos mediante el test de la U de Mann-Whitney se obtuvo una U de 692,500, con $p = 0,010$. La diferencia de selenio entre los grupos fue estadísticamente significativa.

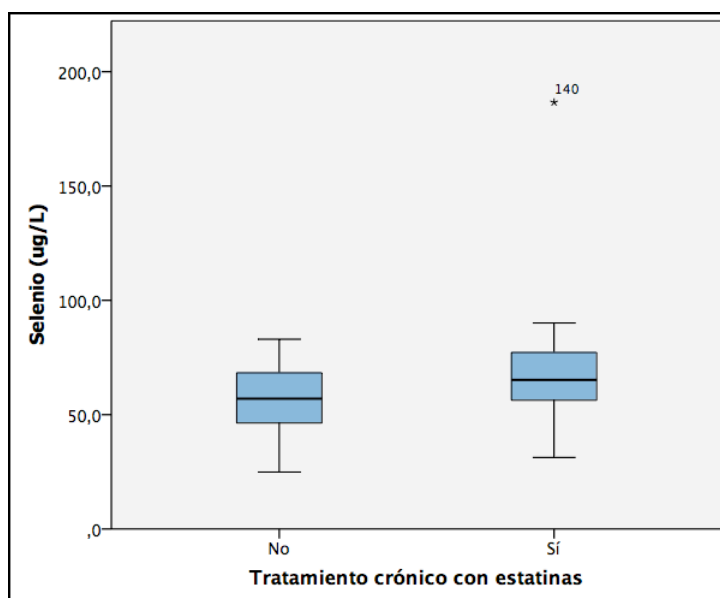


Figura 6-23. Selenio plasmático según tratamiento con estatinas

Comparación de la frecuencia de hiposelenemia entre grupos

El recuento de casos y el recuento esperado de hiposelenemia en cada grupo se recogen en la tabla 5-43. Las frecuencias de la alteración en el elemento traza se compararon mediante χ^2 que, con un valor igual a 3,076 y 1 grado de libertad, tuvo una $p = 0,079$, cercano al límite de significación estadística.

Tabla 6-43. Tabla cruzada de hiposelenemia y tratamiento con estatinas

			Hiposelenemia		Total
			Sí	No	
Tratamiento crónico con estatinas	No	Recuento	34	21	55
		Recuento esperado	29,9	25,1	55,0
		% dentro de estatinas	61,8%	38,2%	100,0%
	Sí	Recuento	16	21	37
		Recuento esperado	20,1	16,9	37,0
		% dentro de estatinas	43,2%	56,8%	100,0%
Total	Recuento		50	42	92
	Recuento esperado		50,0	42,0	92,0
	% dentro de estatinas		54,3%	45,7%	100,0%

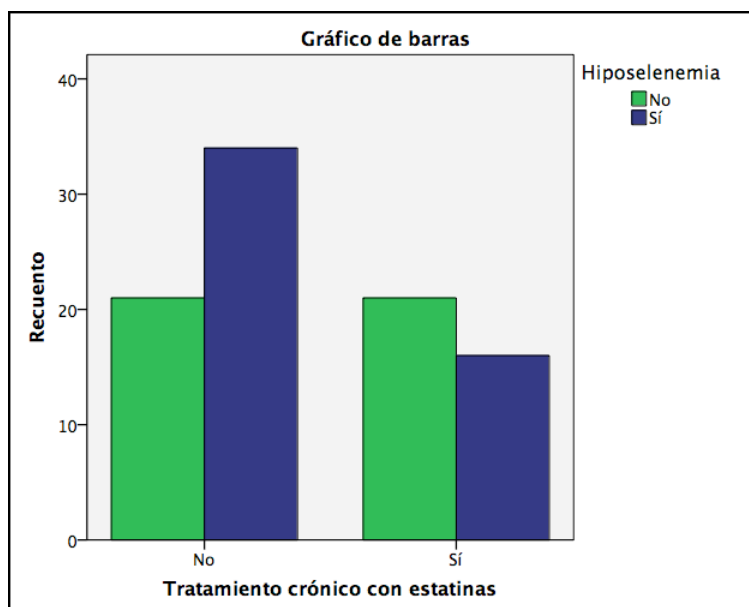


Figura 6-24. Recuento de casos de hiposelenemia por grupo

Odds Ratio de hiposelenemia en tratamiento crónico con estatinas

Ante este resultado ajustado, se investigó si el tratamiento crónico con estatinas podía ser un predictor de la existencia de hiposelenemia mediante el cálculo del *Odds Ratio* por regresión logística. El resultado no fue significativo:

- Tratamiento crónico con estatinas vs. no tratamiento supone un OR de existencia de hiposelenemia de 0,471, con IC 95% de 0,202 – 1,099 ($p = 0,081$).

6.5.5 Selenio y otras variables bioquímicas

Se investigó la relación entre el selenio plasmático y otros marcadores bioquímicos de desnutrición, inflamación y anemia que se emplean en el pronóstico y en el seguimiento del enfermo renal avanzado. Estos marcadores fueron la albúmina, la creatinina, el colesterol, la proteína C reactiva y la hemoglobina. Se seleccionó para el análisis la subcohorte de pacientes en tratamiento sustitutivo renal.

Correlaciones bivariadas

Se estimaron las correlaciones bivariadas entre el selenio y el resto de marcadores bioquímicos mediante el estadístico no paramétrico Rho de Spearman en el grupo de pacientes y en el de sujetos control. Los resultados se recogen en la tabla 5-44.

Tabla 6-44. Análisis de correlaciones bivariadas con el selenio plasmático

	Grupo de pacientes		Grupo de controles	
	Rho de Spearman	p	Rho de Spearman	p
Albúmina	0,440	0,000	0,078	0,730
Creatinina	0,367	0,001	0,030	0,754
Colesterol	0,278	0,011	-0,079	0,404
PCR	-0,076	0,504	-	-
Hemoglobina	0,147	0,178	0,023	0,816

El selenio se correlacionó positiva y significativamente con la albúmina, la creatinina y el colesterol, pero solo en el grupo de pacientes con ERC.

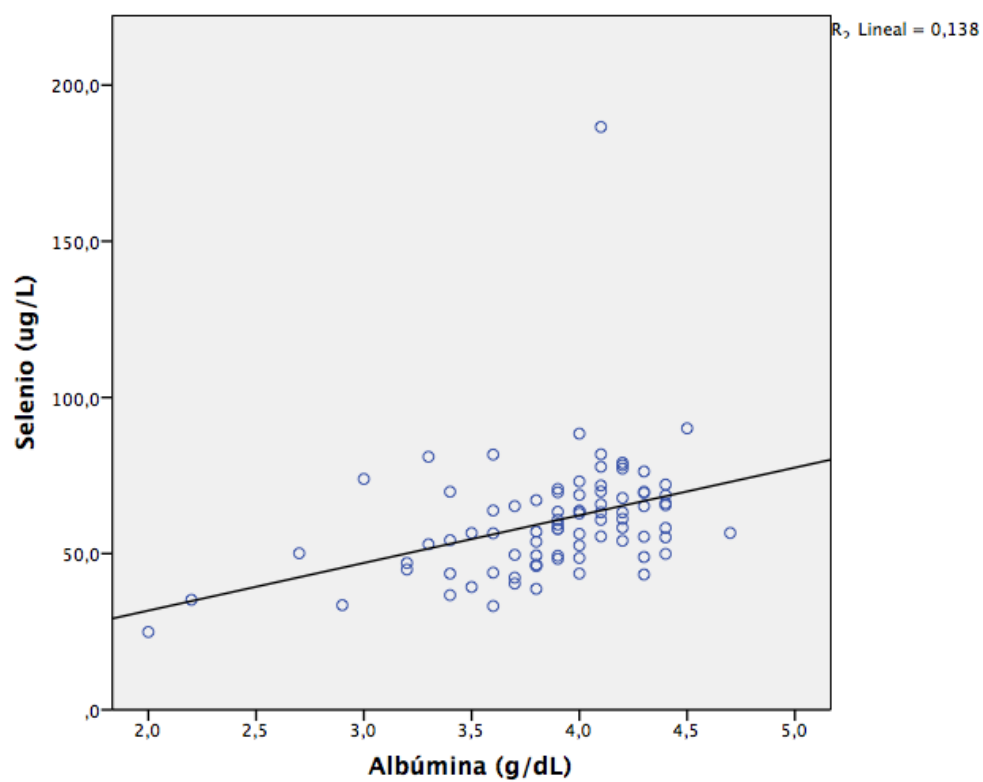


Figura 6-25. Diagrama de dispersión de selenio y albúmina en el grupo de pacientes

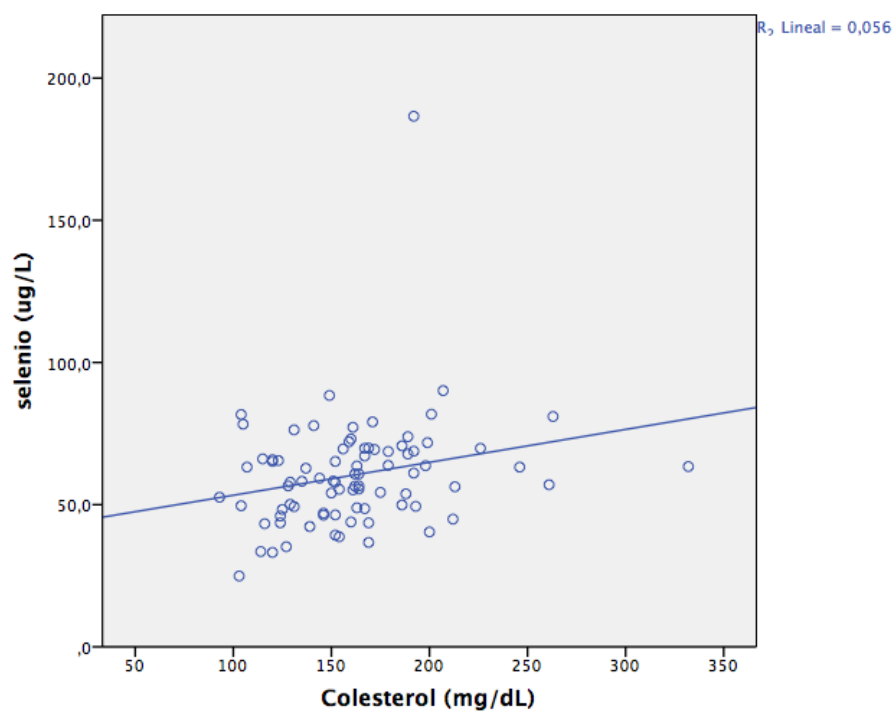


Figura 6-26. Diagrama de dispersión de selenio y colesterol en el grupo de pacientes

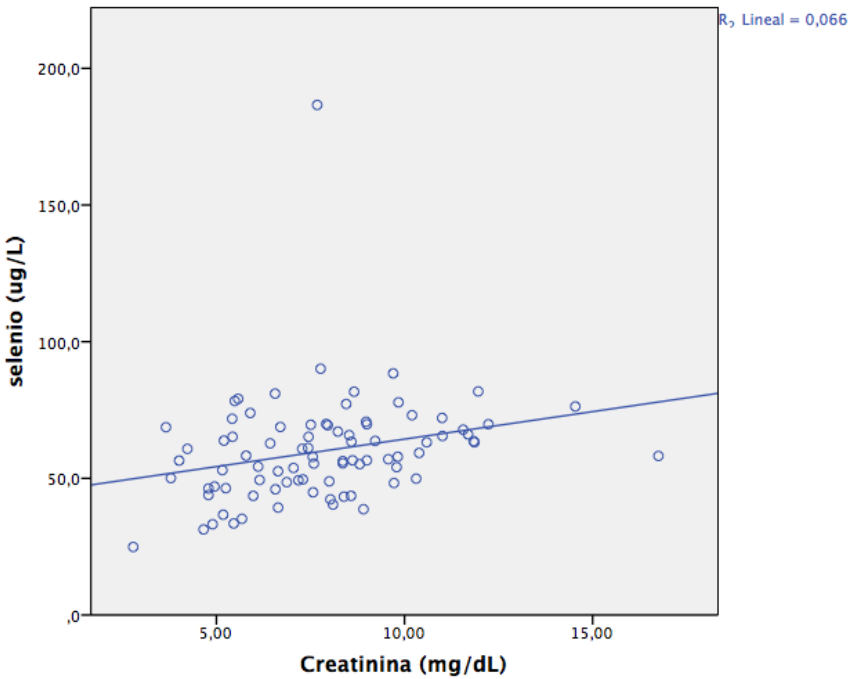


Figura 6-27 Diagrama de dispersión de selenio y creatinina en el grupo de pacientes

Análisis de regresión logística

Se categorizaron las variables analíticas en distintos grupos de acuerdo a puntos de corte utilizados en la toma de decisiones en el seguimiento de estos pacientes (albúmina, creatinina y hemoglobina) o al intervalo de referencia del laboratorio (colesterol y PCR). Los agrupamientos se describen en la tabla 5-45.

Tabla 6-45. Categorización de variables.

Variable continua	Variable dicotómica	
	NO	SÍ

Hipoalbuminemia (70)		
Albúmina	$\geq 3,8$ g/dL	$< 3,8$ g/dL
Creatinina baja (71)		
Creatinina	≥ 10 mg/dL	< 10 mg/dL
Colesterol bajo (70)		
Colesterol	≥ 100 mg/dL	< 100 mg/dL
PCR alta		
PCR	≤ 5 mg/L	> 5 mg/L
Anemia (72)		
Hemoglobina	≥ 10 g/dL	< 10 g/dL
Hipercalcemia (73)		
Calcio	$\leq 10,4$ mg/dL	$> 10,4$ mg/dL
Hiperfosfatemia (73)		
Fosfato	$\leq 4,5$ mg/dL	$> 4,5$ mg/dL
PTH elevada (73)		
PTH	≤ 585 pg/mL	> 585 pg/mL
PTH baja (73)		
PTH	≥ 130 pg/mL	< 130 pg/mL

Las frecuencias de las alteraciones analíticas agrupadas con y sin hiposelenemia se compararon mediante χ^2 (tabla 5-46). Hubo diferencia estadísticamente significativa en los porcentajes de pacientes con hipoalbuminemia y con creatinina por encima o debajo de 10 mg/dL.

Tabla 6-46. Frecuencias de alteraciones analíticas con y sin hiposelenemia

	Hiposelenemia		p
	Sí	No	
Hipoalbuminemia (%)	38,8	16,7	0,027
Creatinina baja (%)	93,9	69,4	0,003
Colesterol bajo (%)	6,1	0,0	0,259 ^a
PCR alta (%)	61,2	55,6	0,600
Anemia (%)	10,2	5,6	0,694 ^a
Hipercalcemia (%)	4,1	5,6	1,000 ^a
Hiperfosfatemia (%)	37,5	52,8	0,163
PTH elevada (%)	13,2	10,7	1,000 ^a
PTH baja (%)	18,4	25,0	0,518

Contraste realizado mediante test χ^2 o ^aprueba exacta de Fisher. p: nivel de significación.

Se calcularon los *Odds Ratio* de hiposelenemia para las alteraciones analíticas hipoalbuminemia y creatinina baja mediante regresión logística binaria condicional “hacia atrás” (Tabla 5-47). Ambas variables permanecen en la ecuación de regresión, aunque el intervalo de confianza al 95% para el exponencial de B de la creatinina baja incluye el 1.

Tabla 6-47. Resultados de la regresión logística

	OR de hiposelenemia	IC 95%	p
Hipoalbuminemia	3,579	1,329 – 9,639	0,012

Creatinina baja	3,842	0,908 – 16,269	0,068
------------------------	-------	----------------	-------

La prueba de bondad de ajuste de Hosmer y Lemeshow resultó no significativa ($p = 0,780$), concluyéndose que el modelo se ajusta adecuadamente a los datos.

Análisis de supervivencia

Se analizó si la existencia de hiposelenemia continúa siendo un modificador del riesgo de mortalidad cuando se ajusta por el resto de alteraciones analíticas mediante la regresión de Cox condicional “hacia atrás”. Se seleccionaron las covariables mediante análisis univariado ajustado por edad (Tabla 5-48). Se introdujeron en el modelo las variables categóricas de selenio y albúmina y la interacción hipoalbuminemia-hiposelenemia. En el paso 1 se introdujeron las variables y en el paso 2 se eliminó la interacción hipoalbuminemia-hiposelenemia. Los HR de mortalidad por cualquier causa según el modelo 4 se recogen en la Tabla 5-48. Permanecen en la regresión de Cox las variables edad, hiposelenemia e hipoalbuminemia. La hiposelenemia es un potente biomarcador predictor de mortalidad, independiente de la hipoalbuminemia, en la subcohorte de pacientes en diálisis.

Tabla 6-48. Hazard Ratios de mortalidad por cualquier causa según alteraciones analíticas (modelo 4)

	Análisis univariado		Análisis multivariado (modelo 4)	
	HR (IC 95%)	p	HR (IC 95%)	p
Hiposenemia	3,031 (1,443 – 6,367)	0,003	3,403 (1,592 – 7,275)	0,002
Hipoalbuminemia	2,926 (1,472 – 5,814)	0,002	2,986 (1,530 – 5,828)	0,001
Creatinina baja	Coeficientes no convergen		-	-
Hipocolesterolemia	0,296 (0,040 – 2,166)	0,230	-	-

PCR alta	1,921 (0,959 – 3,846)	0,065	-	-
Anemia	2,433 (0,932 – 6,348)	0,069	-	-

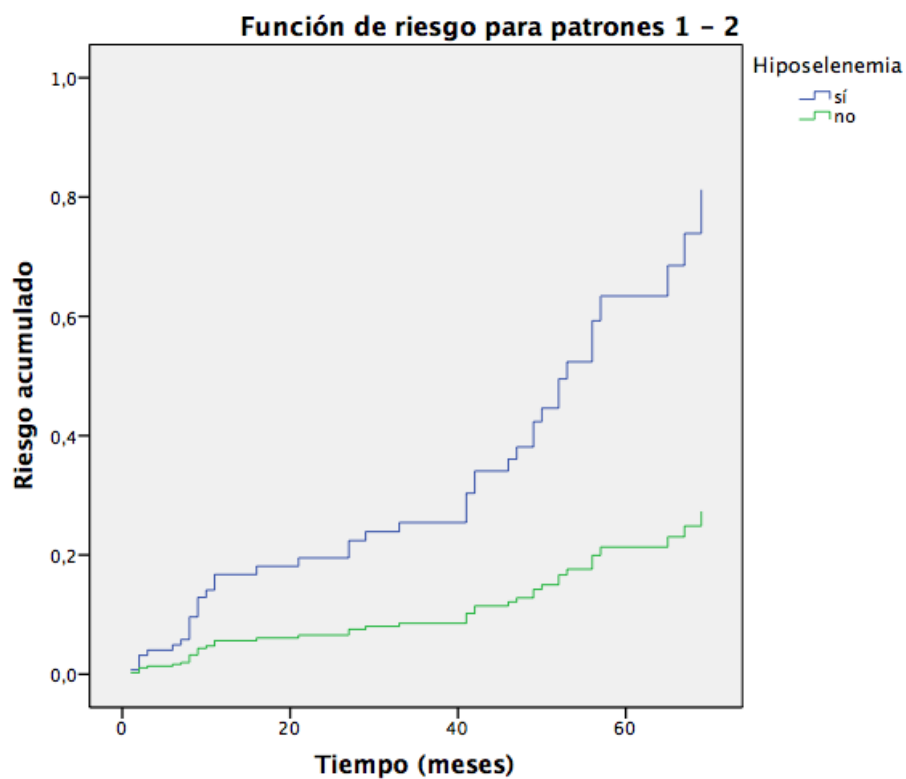


Figura 6-28. Función de riesgo de mortalidad por cualquier causa en la media de covariables con y sin hiposelenemia (modelo 4)

Verificación del modelo

Para verificar el cumplimiento del criterio de proporcionalidad de los riesgos, se computó la covariable hiposelenemia como estrato y se representó gráficamente el logaritmo de la función de riesgo acumulado frente al tiempo (gráfico “log menos log”). Las curvas no se cruzan, apoyando que se cumple el criterio de riesgos proporcionales (Figura 5-29) (68).

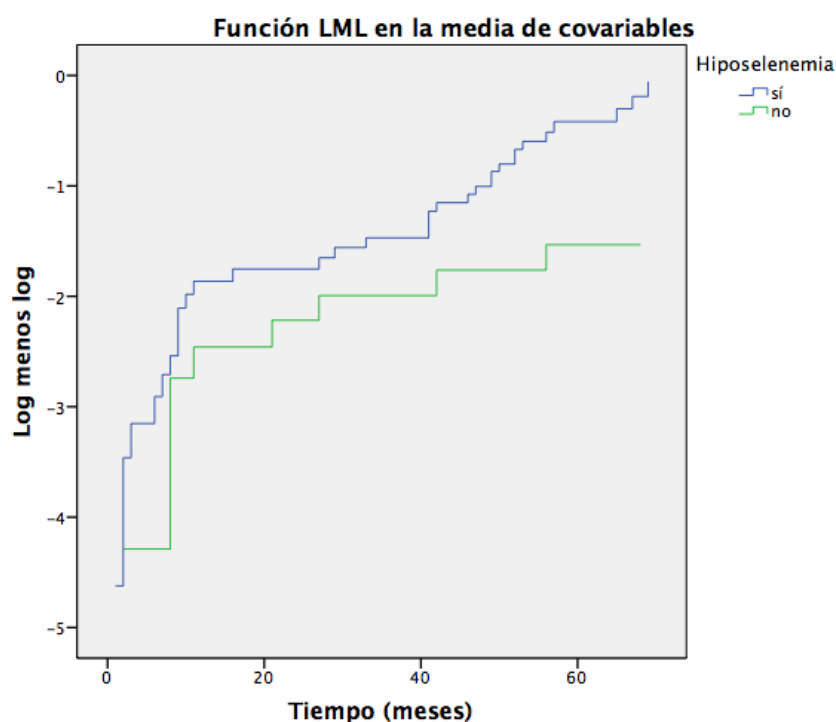


Figura 6-29. Representación del logaritmo de la función de riesgo acumulado en cada estrato frente al tiempo (verificación modelo 4)

Para estimar la bondad de ajuste del modelo, se calculó el PI para cada sujeto de la cohorte. Se construyeron 3 grupos de riesgo categorizando los PI en tertiles. Esta variable se añadió al modelo, encontrándose que la mejora no era significativa ($p = 0,634$) (Tablas 5-49 y 5-50). Se concluye que el modelo tiene una bondad de ajuste global a los datos adecuada.

Tabla 6-49. Cálculo de los coeficientes del modelo con la variable de grupos de riesgo categorizados en tertiles para la estimación de la bondad de ajuste (modelo 4)

Pruebas ómnibus de coeficientes de modelo ^c										
Paso	Logaritmo de la verosimilitud -2	Global (puntuación)			Cambio respecto a paso anterior			Cambio respecto a bloque anterior		
		Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.
1 ^a	274,120	62,900	4	0,000	65,425	4	0,000	65,425	4	0,000
2 ^b	274,347	62,245	3	0,000	0,227	1	0,634	65,199	3	0,000

a. Variables entradas en el número de paso 1: Edad PCR_alta Hiposelenemia
Tertil_de_riesgo_modelo_4

- b. Variable eliminada en el número de paso 2: Tertil_de_riesgo_modelo_4
- c. Número de bloque de inicio 1. Método = Retroceder por paso (LR condicional)

Tabla 6-50. Estimación de la pérdida de χ^2 con la eliminación de variables del modelo 4 en la regresión de Cox condicional “hacia atrás”

Modelo si se elimina el término				
Término eliminado		Pérdida de chi-cuadrado	gl	Sig.
Paso 1	Edad	8,688	1	0,007
	Hiposenemia	5,842	1	0,016
	Hipoalbuminemia	4,272	1	0,039
	Tertil_de_riesgo_modelo_4	0,227	1	0,634
Paso 2	Edad	30,452	1	0,000
	Hiposenemia	11,933	1	0,001
	Hipoalbuminemia	10,064	1	0,002

7.DISCUSIÓN

7 Discusión

El selenio es un elemento químico con varios roles biológicos cuya caracterización se ha ido afinando de una manera fascinante en las últimas décadas. Comenzó con el reconocimiento de su toxicidad, y los análisis posteriores nos han llevado a entender su papel esencial, a reconocer organismos con selenocisteína en lugar de cisteína en el sitio activo de enzimas catalizadoras redox, a esclarecer cómo se incorpora este aminoácido, el número 21, en la traducción de proteínas a partir de un codón UGA, habitualmente de parada, o incluso a relacionar la disminución severa y prolongada del selenio oceánico con tres de las grandes extinciones masivas (74).

Fuera del ámbito de la investigación, la medición de selenio total en suero o plasma humano es una prueba disponible en numerosos laboratorios de análisis clínicos. Está indicada la determinación de selenio en muestras biológicas si hay sospecha de déficit o de intoxicación de este elemento traza. Revisadas las distintas guías clínicas de manejo de patología en la que el selenio podría tener cierta relevancia, como en enfermedades cardiovasculares, oncológicas, patología tiroidea, pre-eclampsia, enfermedad crítica o enfermedad renal avanzada, solo aparecen recomendaciones de monitorización del selenio tras cirugía bariátrica malabsortiva (75). En este caso, se recomienda hacer una medida de selenio si el paciente presenta anemia o fatiga inexplicada, diarrea persistente, cardiomiopatía o enfermedad metabólica ósea. Nosotros pensamos que esta prueba bioquímica puede ser de utilidad en otras circunstancias, y hemos investigado su interés como marcador pronóstico en pacientes con enfermedad renal crónica avanzada.

7.1 Desarrollo, validación y optimización de métodos de determinación de selenio por ETAAS

La determinación de selenio en suero o plasma está al alcance de muchos laboratorios de análisis clínicos. Los métodos más recomendados en la actualidad para su determinación en este tipo de laboratorio son la espectrometría de absorción atómica electrotérmica con corrección de fondo por Zeeman y la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo. Con elevado número de muestras y la necesidad de determinar muchos elementos traza puede compensar la inversión en un equipo de ICP-MS y en la especialización del personal que debe operarlo. El manejo sencillo de los equipos de absorción atómica electrotérmica, el bajo coste de reactivos y consumibles y los métodos robustos que pueden desarrollarse hacen que esta técnica sea de elección en el caso de laboratorios pequeños y medianos.

Sin embargo, la determinación de selenio no está exenta de complicaciones por ninguna de las dos técnicas. En el caso de la ETAAS, la línea de resonancia del selenio que se utiliza en su medición está sujeta a interferencias espectrales que requieren una cuidadosa elección del modificador de matriz y las temperaturas y tiempos de calcinación y atomización.

Los dos métodos de medición de selenio sérico y plasmático empleados en los estudios de esta tesis doctoral cumplieron de manera satisfactoria las especificaciones deseables de la calidad basadas en los datos de variación biológica del analito (63,64), aunque el desempeño del equipo Perkin-Elmer fue superior al del equipo VARIAN.

En numerosas publicaciones se emplean modificadores basados en paladio no reducido. En nuestro caso, se intentó sin éxito tanto en el espectrofotómetro VARIAN como en el Perkin-Elmer. Fue necesario el empleo de reductores del paladio, en el primer caso ácido ascórbico y en el segundo cloruro de hidroxilamina, que permitieron obtener adecuada exactitud y precisión en ambos equipos. El uso de ácido ascórbico está ampliamente documentado como reductor del paladio en la medición del selenio (52), mientras que son pocas las publicaciones que refieren el uso de cloruro de hidroxilamina, ya sea en la medición de selenio o de otros metales (76–78). No se probó ácido ascórbico en el equipo Perkin-Elmer ni cloruro de hidroxilamina en el equipo VARIAN, por lo que carecemos de datos para comparar el efecto de sendos reductores en la modificación del selenio.

Las imprecisiones halladas (4,7 - 5,8% en VARIAN y 4,40% en Perkin-Elmer), superior la del método optimizado en Perkin-Elmer, fueron del orden de magnitud de las encontradas en la bibliografía (50,54,61). Los límites de detección (11,1 µg/L en VARIAN y 6,7 µg/L en Perkin-Elmer) y de cuantificación (33,7 µg/L en VARIAN y 20,2 µg/L en Perkin-Elmer) fueron, de nuevo, superiores en Perkin-Elmer, y suficientemente bajos para la medición de selenio en las muestras de la cohorte de pacientes y de los sujetos control. Fueron comparables a los obtenidos por otros métodos publicados (54,79), pero superiores a los 0,8 µg/L que suponen el límite de detección más bajo obtenido por ETAAS (52).

Las inexactitudes encontradas en sendos métodos fueron muy buenas (1% y -0,9% en VARIAN y 0,09% en Perkin-Elmer), y sirvieron para confirmar que la elección de la calibración con estándares acuosos había sido adecuada. La calibración mediante adición estándar es la más segura y, por tanto, muy recomendable (52), pero multiplica el tiempo de análisis por tres o por cuatro, dependiendo del número de adiciones. Por este motivo, se considera adecuado el análisis por calibración acuosa, si su desempeño es aceptable, en el marco del laboratorio clínico (50).

No se investigaron las causas que pudieron llevar al mejor desempeño del método optimizado en el espectrofotómetro Perkin-Elmer. Difirió el reductor de paladio empleado, pero las características de varios elementos de este analizador pueden explicar por sí solas una mejora en la sensibilidad y en la precisión, principalmente los tubos de grafito calentados transversalmente, la lámpara de descarga sin electrodos y un automuestreador más robusto.

El horno de grafito de VARIAN se calienta longitudinalmente, lo que puede provocar interferencias por condensación del analito en los extremos más fríos. En los años 90 del siglo pasado, Perkin-Elmer introdujo tubos calentados transversalmente que proporcionan mejores condiciones isotérmicas durante la atomización y mayor reproducibilidad. Pueden sufrir pérdidas del analito por difusión del vapor fuera del tubo debido a que éste es más corto, pero los tubos *end-capped* limitan la abertura en los extremos del tubo, con menores pérdidas de vapor atómico (80).

Las lámparas de cátodo hueco consisten en un ánodo de Wolframio y un cátodo cilíndrico cerrados herméticamente en un tubo de vidrio lleno de un gas inerte, habitualmente argón. El cátodo bien está construido con el elemento cuyo espectro se

quiere obtener o bien sirve de soporte para una capa de dicho elemento. Se aplican potenciales elevados entre los electrodos, lo que produce la ionización del gas inerte. Los cationes gaseosos adquieren la suficiente energía cinética como para arrancar algunos átomos de la superficie del cátodo, algunos de ellos en estado excitado.

Las lámparas de descarga sin electrodo están constituidas por un tubo de cuarzo cerrado herméticamente que contiene un gas inerte y una pequeña cantidad del elemento o de una de sus sales. La ionización del gas inerte se consigue con un intenso campo de radiofrecuencia o de microondas. Los iones gaseosos son acelerados por el mismo campo hasta que obtienen energía suficiente para excitar átomos del elemento cuyo espectro se desea. Producen mayores intensidades que las lámparas de cátodo hueco, por lo que permiten obtener sensibilidades mejores y límites de detección más bajos (81).

Las diluciones empleadas en sendos métodos difirieron, siendo mayor la dilución en el equipo VARIAN (~1:13 vs. ~1:8; diluciones finales en el atomizador), lo que contribuyó a un límite de detección más elevado en este equipo.

Diluciones altas de las muestras de suero son convenientes para minimizar la aparición del residuo carbonáceo que acompaña a la determinación de elementos traza por ETAAS en muestras con alto contenido en proteínas (52). A pesar de las diluciones empleadas, el depósito de este residuo en el tubo de grafito fue un problema en ambos espectrofotómetros, que puede afectar a la sensibilidad y a la precisión de la medida. Para combatirlo se optó por el uso de oxidantes (peróxido de hidrógeno, ácido nítrico) inyectados en el atomizador con una frecuencia alta. Se logró una combinación eficaz de cantidad de oxidante y frecuencia en ambos casos, pero con la consecuencia de un gran acortamiento de la vida útil del tubo de grafito, en algún caso hasta la cuarta parte del número de determinaciones esperado.

Los espectrofotómetros utilizados cuentan con automuestreador automático, pero esto no supone la completa automatización de la determinación de selenio. Las muestras, una vez diluidas, debían homogeneizarse mediante vórtex en los momentos previos a su aspiración por el automuestreador para obtener buena precisión en las réplicas. Esto es una desventaja para la implementación de estos métodos en el laboratorio clínico, dado que retiene a un trabajador en el espectrofotómetro durante toda la operación, a diferencia de otros métodos por ETAAS para la determinación de otros metales u otras matrices como la orina.

7.2 Valores de referencia de selenio en suero

Las concentraciones de selenio en suero o plasma varían en sujetos sanos en función de su localización geográfica, debido fundamentalmente al diferente contenido de selenio en los suelos de las distintas áreas geográficas (82) por lo que no es posible establecer valores de referencia universales. La recomendación unánime es la del uso de intervalos de referencia propios en cada laboratorio, por lo que se estableció este objetivo en la presente tesis doctoral.

La concentración media de selenio en la población española es aproximadamente 74 µg/L, según el meta-análisis realizado por J Carmona-Fonseca en 2010 (48), 60 µg/L según la revisión de MP Rayman de 2000 (83) y 72 µg/L según la de GF Combs de 2001 (84).

La concentración media determinada en población adulta sana del área sanitaria del Hospital Universitario Severo Ochoa (Leganés y Fuenlabrada) es $89,93 \pm 12,60$ µg/L, superior a las medias estimadas en las tres revisiones citadas. Para una comparación más apropiada, se revisaron publicaciones que estimaban valores normales en población adulta y especificaban el área o región española (Tabla 6-1).

Tabla 7-1. Valores de referencia de selenio en suero o plasma en distintas regiones españolas

Área	N	Sexo	Edad	[Se] (µg/L) Media/Mediana	DE	Intervalo	Diferencia sign. entre sexos	Referencia
Andalucía	340	H/M	25 – 60	82,7	48,3	28 – 200	No	(85)
Asturias	-	-	-	63,95	8,69	50,6 – 79,8	-	(86)
Barcelona	150	H/M	18 – 70	80,7	10,0	60 – 106	Sí	(87)
Barcelona	85	H	-	84,1	10,3	60 – 106	-	
Barcelona	65	M	-	77,1	12,5	61 – 102	-	
Barcelona	156	H/M	19 – 68	82,2	17,5	49,4 – 145,4	-	(88)
Canarias	395	H/M	-	74,7	25,2	-	No	(89)
Granada	130	H/M	-	74,9	-	30,2 – 175	No	(90)
Granada	84	H/M	21 – 59	76,7	17,3	45,6 – 121	-	(91)
Leganés	118	H/M	26 – 93	89,93	12,6	63 – 118	No	
Madrid	118	H/M	15 – 65	60,0	-	38,0 – 111,0	No	(51)
Madrid	375	H/M	20 – 70	79,6	11,7	65 – 114	No	(92)

Toledo	47	H/M	22 – 61	-	-	59,1 – 88,1	-	(93)
Valencia	287	H/M	20 – 45	81	-	53,0 – 109,0	No	(94)
Zaragoza	149	H/M	>15	95,3	12,4	71,0 – 119,6	No	(95)

Tabla ampliada a partir de la establecida por López-Bellido et al (1)

Las concentraciones medias reportadas están en el rango 60 – 95,3 µg/L, y la media de nuestra población es la segunda más alta (89,93 µg/L). Los extremos se corresponden a población de Zaragoza (95,3 µg/L) (95) y Madrid (60 µg/L) (51).

Los valores publicados con los que estaríamos más relacionados por proximidad geográfica son los dos estudios de Madrid y el de Toledo. El de Toledo (93) es un pequeño estudio que no reporta valor medio o mediana, pero cuyo límite superior del intervalo de referencia se encuentra por debajo de nuestro valor medio. Los dos estudios de Madrid reportan valores medios también inferiores al de la población de Leganés. En un caso, el estudio data de 1992 (51) y valoró el selenio de un grupo de sujetos sanos con rango de edad inferior al nuestro. La diferencia metodológica más reseñable es el empleo de corrección de fondo con lámpara de deuterio. El otro estudio es de 2016 (92), valoró a población algo más joven y reporta un selenio promedio de 79,6 µg/L, inferior a nuestro resultado pero más próximo a éste que al del estudio de 1992. Las diferencias metodológicas son el empleo de paladio no reducido como modificador en la determinación de selenio y el cálculo del intervalo de referencia mediante media y desviación estándar. El número de sujetos triplica el de nuestro estudio y obtienen un intervalo de referencia más estrecho, pero incluido en nuestro intervalo: 65 – 114 vs. 63 – 118. Dos métodos distintos de cálculo de valores de referencia llevan a dos intervalos muy similares en población de la misma región.

Ninguno de los estudios citados en la Tabla 6-1 valoró la necesidad de intervalos de referencia diferenciados por edad. La edad avanzada parece acompañarse de una disminución de los niveles sanguíneos de selenio según varias revisiones (1,96), pero no está suficientemente estudiado. En nuestro análisis, no se correlacionó el selenio sérico con la edad, con un Rho de Spearman próximo a 0. A favor de nuestro resultado está la proporción de sujetos mayores de 60 años, superior al 50% del grupo control.

Con respecto a la influencia del sexo, nuestros resultados coinciden con 8 de los 9 trabajos citados en la Tabla 6-1 que lo estudiaron. La conclusión general es que no hay diferencias por sexo en los valores de selenio sérico.

Para realizar sendos estudios de necesidad de partición de los valores de referencia se usó el método de Harris y Boyd recomendado por el CLSI (55) y se contó con un número de muestras adecuado.

7.3 Selenio en enfermedad renal crónica avanzada

En la comparación de los valores de selenio sérico o plasmático de la cohorte de pacientes con ERC avanzada con el grupo de sujetos control encontramos una diferencia estadísticamente significativa. Los valores de la cohorte fueron significativamente inferiores y, comparados con el intervalo de referencia del laboratorio, el 52% de los pacientes tenía hiposelenemia. Este porcentaje asciende hasta el 57% en la subcohorte de ERC en tratamiento sustitutivo.

El selenio bajo en pacientes con ERC está ampliamente documentado. En un meta-análisis de 2009 (97) se analizaron los resultados de 46 cohortes, que englobaron 1496 pacientes en hemodiálisis y 1443 sujetos control. La diferencia media estandarizada de selenio (media de la población en diálisis menos media de la población control entre la desviación estándar global) fue de -1,50 (rango: -9,19 – 1,97), con una heterogeneidad entre estudios elevada ($I^2 = 91\%$). En cuatro estudios publicados posteriormente, tres encuentran selenio sérico significativamente inferior en los pacientes y uno no (98–101). Un estudio de Tonelli *et al* publicado en 2017 (102) encuentra que niveles bajos de selenio (inferiores al percentil 5 de una población sana de referencia tomada de una publicación francesa (103)) se presentan solo en un 1,8% de los pacientes en diálisis en distintos centros de Canadá, mientras que el 74,2% tiene valores superiores al percentil 95. Este contraste entre sus resultados y los de la mayoría de publicaciones, que varían entre la prevalencia de hiposelenemia o normoselenemia, pero que ninguno reporta la existencia de hiperselenemia en los pacientes de diálisis, pone de manifiesto el ruido y la confusión que puede generar una elección inadecuada del intervalo de referencia.

A pesar de la conocida alta prevalencia de hiposelenemia en la ERC avanzada, los estudios de suplementación con selenito o levadura enriquecida realizados hasta la fecha son pocos y de corta duración (entre 8 semanas y 6 meses) (104–111). En general, se obtuvieron elevaciones del selenio sérico o plasmático de manera similar a los ensayos en otras poblaciones, pero los resultados sobre la actividad GPx son menos concluyentes. Valoraron distintos marcadores de daño oxidativo, desnutrición, inflamación y anemia, lo que no permite extraer conclusiones, y ninguno estudió los efectos sobre la supervivencia. Algunos ensayos a largo plazo en otras poblaciones han hallado efectos sobre la mortalidad global, cardiovascular o por cáncer, aunque con resultados discordantes que parecen indicar que la suplementación produce beneficios solo en caso de hiposelenemia (12).

Con nuestro estudio, contribuimos a la evidencia de valores bajos de selenio en esta población, así como a la relación de hiposelenemia y aumento del riesgo de mortalidad. El selenio parece que bien juega un papel en la morbilidad de estos pacientes, o bien es un indicador de la existencia de otros factores causales, pero no conocidos o aún no relacionados. Ante un selenio total bajo que se relaciona con un aumento de la mortalidad caben varias posibilidades:

- puede que el selenio total o una o varias selenoproteínas sean buenos marcadores bioquímicos de pronóstico:
 - puede que estén relacionados con causas de la morbilidad
 - pueden ser marcadores pronósticos sin ser factores causales
- puede que el selenio total o una o varias selenoproteínas permitan seleccionar a los pacientes que se pueden beneficiar de un manejo diferente:
 - puede que algunos pacientes se beneficien de la suplementación con selenio
 - puede que algunos pacientes se beneficien de otras medidas especiales de nutrición o de antiinflamación
- puede que el selenio parezca comportarse como predictor pronóstico en numerosos estudios porque se relaciona con otro marcador causal y más potente, cuya caracterización haría abandonar las líneas de investigación del elemento traça y la enfermedad renal crónica.

Para explorar estas posibilidades son necesarios nuevos estudios de supervivencia y ensayos clínicos de suplementación.

7.3.1 Selenio, candidato a marcador de desgaste proteico-energético

Los estudios epidemiológicos demuestran repetidamente una fuerte asociación entre las medidas de desnutrición y de inflamación en pacientes en diálisis y la alta mortalidad, tanto cardiovascular como infecciosa. Entre el 30 y el 60% de los pacientes en América del Norte y Europa tiene marcadores de inflamación elevados (112). Las citoquinas proinflamatorias parecen aumentar sinérgicamente los efectos nocivos que llevan al desgaste proteico energético (DPE) (113). Otras consecuencias de la inflamación crónica son la anemia refractaria y las alteraciones en el metabolismo óseo-mineral. El DPE, muy frecuente en el enfermo renal, es el estado patológico en el que hay un descenso continuado tanto de los depósitos proteicos como de las reservas energéticas, incluyendo pérdida de grasa y músculo (70,114). Las posibles causas se clasifican en dos grupos: aquellas que provocan un descenso en la ingesta y aumento de la pérdida de nutrientes, como la anorexia, las dietas restrictivas y la pérdida dialítica de nutrientes; y las que aumentan el catabolismo, como la acidosis metabólica, alteraciones endocrinas, aumento del estrés oxidativo y acumulación de toxinas urémicas.

Los criterios diagnósticos de DPE se clasifican en cuatro categorías: criterios bioquímicos, masa corporal, masa muscular e ingesta. Se requiere cumplir al menos un criterio de tres de ellas para el diagnóstico de DPE. Los criterios bioquímicos son albuminemia $< 3,8$ mg/dL (verde de bromocresol), prealbuminemia < 30 mg/dL (sólo en pacientes en diálisis) y colesterol sérico < 100 mg/dL (70). En la cohorte de pacientes con ERC avanzada en diálisis, el 49,4% tenía hipoalbuminemia y solo el 3,5% tenía colesterol inferior a 100 mg/dL. Solo contamos con mediciones de prealbúmina de 10 pacientes, por lo que no se valoró la asociación de este marcador con el selenio.

La creatinina no es un criterio bioquímico en DPE, pero se emplea en la valoración del estado nutricional de los pacientes con ERC avanzada (71). En pacientes estables anúricos, una baja creatinina sérica pre-diálisis sugiere baja masa muscular o ingesta proteica insuficiente y se recomienda que se valore su estatus nutricional. No hay consenso sobre el punto de corte a emplear, pero estaría alrededor de 10 mg/dL. En nuestra cohorte de pacientes, el 83,5% tenía creatinina baja pre-diálisis.

La PCR es un marcador de inflamación que predice con precisión mortalidad en ERC avanzada (115). En nuestra cohorte, el 58,8% de los pacientes tenía la PCR elevada.

La hemoglobina es el marcador de anemia que se emplea en la toma de decisiones de tratamiento con hierro, con agentes estimulantes de la eritropoyesis o de transfusión sanguínea. En nuestra cohorte, el 8,2% de los pacientes tenía hemoglobina inferior a 10g/dL.

El selenio plasmático de los pacientes en tratamiento sustitutivo se correlacionó con la albúmina ($Rho = 0,440$), el colesterol ($Rho = 0,278$) y la creatinina ($Rho = 0,367$), y no lo hizo con el resto de marcadores bioquímicos considerados: PCR y hemoglobina.

Otros estudios en pacientes con ERC en diálisis encuentran de manera unánime correlación entre selenio y albúmina (98,116–118) y entre selenio y creatinina (116,117). El selenio se asoció significativamente con el LDL-colesterol y con el HDL-colesterol en los pacientes de este estudio de 2010 (98), mientras que no demostró correlación en este otro trabajo publicado el mismo año (116).

Algunas publicaciones reportan asociación entre selenio y hemoglobina o hematocrito (117,119), a diferencia de los resultados de nuestra cohorte. La PCR se asoció de manera significativa con el selenio sérico en un par de estudios (98,99), y no lo hizo, al igual que en nuestro caso, en otras dos publicaciones (116,117).

Así, las correlaciones positivas que encontramos entre el selenio y los marcadores nutricionales considerados se suman a la evidencia disponible de estas asociaciones. La posible asociación con el marcador de inflamación más utilizado, sin embargo, se nos escapa. En nuestra cohorte, todos los valores de proteína C reactiva se obtuvieron mediante ensayo inmunturbidimétrico, que no es un método ultrasensible. Nuestros resultados de no correlación se corresponden con los de dos estudios, uno con 261 sujetos en diálisis y medición de PCR ultrasensible (116) y otro con 22 sujetos y PCR determinada por nefelometría (117). Los otros dos trabajos que sí encuentran correlación negativa entre PCR y selenio contaron con más sujetos (1041 (98) y 40 (99)) y emplearon métodos ultrasensibles. La frecuente elevación de la PCR en los pacientes en diálisis hace parecer innecesaria la medición ultrasensible de esta proteína, pero no podemos descartar la posibilidad de encontrar correlación con el selenio en nuestra cohorte usando otro ensayo de PCR.

El selenio en el plasma se corresponde, en condiciones normales, en un 50-60% con la selenoproteína P, proteína con función transportadora de selenio y antioxidante, en un 10-30% con la glutatión peroxidasa plasmática (GPx3), de síntesis renal, y en un 10-

13% se encuentra unido a albúmina como selenometionina (120–122). Los resultados de las comparaciones de la actividad GPx3 encuentran una actividad disminuida en ERC y muy disminuida en ERC avanzada (104), pero no hay homogeneidad en los resultados de asociación entre la actividad GPx y el selenio sérico o plasmático, con sólo algunos estudios encontrando correlación significativa. La disminución del selenio plasmático en ERC avanzada, por tanto, no refleja exclusivamente una disminución en la GPx3.

En nuestra serie, el selenio mostró correlación positiva débil con los tres marcadores de desnutrición valorados. En el grupo control, formado por sujetos normonutridos, con los marcadores bioquímicos dentro del rango normal, es de esperar que el selenio no se asocie con la albúmina, suponiendo el selenio unido a esta proteína una décima parte del selenio total plasmático. La asociación, aunque débil, que sí se observa en los sujetos con ERC avanzada sugiere que las causas de disminución de la albúmina podrían coincidir en mayor o menor grado con las del selenio. Además, la proporción de selenio unido a albúmina en estos pacientes podría ser superior a la de los sujetos sanos.

Los resultados de las correlaciones bivariadas apuntan a una posible utilidad del selenio como marcador de nutrición en ERC avanzada. Cuando se clasificaron a los pacientes en función de que tuvieran hiposelenemia o no, se obtuvieron dos grupos con diferencia significativa en el tiempo en diálisis ($p = 0,018$), la albúmina ($p = 0,003$), la creatinina ($p = 0,004$), el colesterol ($p = 0,038$) y el fosfato ($p = 0,025$). Así, la clasificación según hiposelenemia llevó a dos poblaciones diferenciadas en el estado nutricional y en el tiempo en tratamiento sustitutivo.

Los pacientes con selenio bajo llevaban más tiempo en diálisis y tenían valores inferiores de los marcadores bioquímicos de desnutrición. Las proporciones de pacientes que cumplían criterios de albúmina y creatinina alteradas fueron significativamente distintas entre los dos grupos. Los pacientes con hiposelenemia presentaron, además, menores niveles de hemoglobina, aunque sin alcanzar la significación estadística ($p = 0,061$). El grupo de normoselenemia tuvo valores superiores de fosfato, lo que sugiere una relación entre las fuentes dietéticas de ambos marcadores o algún efecto sobre el selenio de los tratamientos quelantes del fosfato.

En base a estos resultados, creemos que el selenio puede ser un marcador útil en el diagnóstico y seguimiento del DPE en los pacientes en tratamiento sustitutivo renal.

7.3.2 Selenio y tratamiento crónico con estatinas

Encontramos en nuestra cohorte de pacientes con ERC avanzada una diferencia estadísticamente significativa entre el selenio de los pacientes a tratamiento con estatinas (mediana de 65,2 $\mu\text{g/L}$) y los que no usaban ningún fármaco de esta familia de hipolipemiantes (mediana de 57,0 $\mu\text{g/L}$). Estos resultados están en consonancia con los de otro estudio sobre pacientes italianos en hemodiálisis, que contó con un número similar de sujetos y encontró diferencia significativa entre el grupo tratado con estatinas y el que no ($111,83 \pm 18,82$ vs. $81,65 \pm 19,66$ $\mu\text{g/L}$) (123). Sin embargo, en el estudio italiano, la diferencia entre los valores de selenio de ambos grupos es mucho mayor que la de nuestra cohorte. Los pacientes en tratamiento con estatinas incluso tuvieron una media de selenio superior a la del grupo control ($111,83 \pm 18,82$ vs. $96,47 \pm 15,62$ $\mu\text{g/L}$), aunque no analizan si esta diferencia es significativa o no. En nuestra cohorte, la diferencia entre los grupos tratados o no con estatinas es significativa pero pequeña, y ambas medianas están por debajo del intervalo de referencia.

En los ensayos clínicos llevados a cabo con pacientes hipercolesterolémicos sin ERC, no se demostraron cambios en el selenio plasmático tras 8 semanas de tratamiento con fluvastatina (124), tras 4 meses con simvastatina o atorvastatina (tampoco en la actividad GPx) (125) o tras 4 meses con rosuvastatina (tampoco en GPx) (126). En otro ensayo clínico, el tratamiento con fluvastatina durante 3 meses elevó de manera significativa la actividad GPx eritrocitaria (127). No se analizó el selenio o la actividad GPx plasmática.

Las estatinas son la familia de fármacos más efectiva en la reducción del colesterol sérico. Se dirigen a los hepatocitos e inhiben parcialmente la HMG-CoA reductasa, el primer paso en la biosíntesis de esteroides, y la enzima clave que convierte la HMG-CoA en mevalonato, un precursor del colesterol. Pero, además de esta actividad hipolipemiente, tienen otros efectos como el antiinflamatorio, el antioxidante, el inmunomodulador, el antidiabético, etc. Son los llamados efectos pleiotrópicos de las estatinas (128). Se defiende, por estos efectos, su uso en enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico.

En enfermedad renal crónica, el riesgo coronario es lo suficientemente alto como para justificar la prescripción de estatinas en mayores de 50 años con ERC no dependiente

de diálisis. El riesgo en menores de 50 años es inferior, pero la presencia de factores de riesgo cardiovascular adicionales categoriza a los pacientes en el grupo que se beneficia del uso de estatinas. No se recomienda la prescripción de estatinas a pacientes que ya han iniciado diálisis ya que no hay evidencia de que dicho tratamiento sea beneficioso. Sin embargo, las estatinas no deben necesariamente interrumpirse entre los usuarios existentes cuando inician diálisis (129).

El uso de estatinas en pacientes en hemodiálisis se asoció, en un meta-análisis publicado en 2015, con una reducción de la incidencia de eventos cardíacos ($RR = 0,90$, $p = 0,006$), pero no tuvo efecto sobre la mortalidad cardiovascular ($RR = 0,97$, $p = 0,54$) o sobre la mortalidad global ($RR = 0,98$, $p = 0,49$) (130).

Varias estatinas inhiben la captación y generación de LDL-colesterol oxidado, atenúan la formación de aniones superóxido vasculares y endoteliales mediante la inhibición de las NADH oxidasas y conservan los niveles relativos de vitamina E, vitamina C y antioxidantes endógenos como la ubiquinona y el glutatión en partículas de LDL. Las estatinas no solo disminuyen la cantidad de oxidantes sino que también restauran la de antioxidantes, lo que puede explicar algunos de los efectos clínicos beneficiosos observados (127).

Algunos autores encuentran semejanza entre los efectos secundarios musculares asociados con el tratamiento con estatinas y los síntomas de la deficiencia de selenio (131). La hipótesis que plantean para explicar el parecido sería que las estatinas interfieren con la ruta bioquímica de la isopentenilación de selenocisteína-tRNA, ya que ésta utiliza un metabolito directo del mevalonato, cuya formación bloquean los inhibidores de HMG-CoA reductasa. De este modo se impide la maduración a una molécula de tRNA funcional, lo que resulta en una disminución de las selenoproteínas disponibles.

Esta hipótesis se apoya en experimentos que encuentran que la síntesis de selenoproteínas está muy disminuida tanto in vitro como en ratones transgénicos con bloqueo del sitio de isopentenilación en la molécula Sec-tRNA. Asimismo, apoyan la hipótesis los experimentos en cultivos celulares cuya síntesis de selenoproteínas está muy disminuida tras adición de lovastatina (132,133).

Según esta hipótesis, la incorporación de selenocisteína a las selenoproteínas estaría impedida. La mayor concentración de selenio total en el plasma que encontramos

en los pacientes en tratamiento con estatinas no se correspondería con una mayor actividad de las selenoproteínas del plasma, por lo que tendría que tratarse de otras especies de selenio como selenometionina unida de manera inespecífica a albúmina y a otras proteínas plasmáticas. Son necesarios estudios de especiación para comprobar esta hipótesis.

7.3.3 Selenio y mortalidad

La supervivencia del grupo de pacientes con hiposelenemia fue significativamente más baja que la del grupo con normo o hiperselenemia. Este resultado se obtuvo en el análisis de la cohorte de pacientes con ERC en estadios 4 y 5 y se repitió en la subcohorte de pacientes en tratamiento sustitutivo renal. El selenio plasmático, utilizado con el límite inferior del intervalo de referencia, se comportó como el mejor biomarcador del riesgo de mortalidad, independiente de otros marcadores bioquímicos que generalmente se monitorizan en pacientes con ERC avanzada.

En el análisis de las covariables clínicas y demográficas, la hiposelenemia se comportó como un predictor de mortalidad independiente de la historia de enfermedad cardiovascular, por lo que no se trata de una alteración ligada a este tipo de afecciones. Nuestros resultados suponen que un paciente que tiene historia de enfermedad cardiovascular tiene mayor riesgo de mortalidad si tiene hiposelenemia concomitante. Se confirmó que los modelos calculados mediante regresión de Cox cumplían el criterio de riesgos proporcionales y que se ajustaban adecuadamente a los datos de la cohorte (modelo 3) y subcohorte (modelo B).

No se pudo analizar la relación entre el selenio bajo y la mortalidad por causas cardiovasculares o infecciosas, ya que no estaba incluida en la historia clínica la causa del fallecimiento de 16 de los 49 pacientes fallecidos.

En las búsquedas realizadas en *Pubmed* y en *Cochrane*, se encuentran cuatro estudios que analizan la relación entre selenio plasmático y mortalidad en este tipo de pacientes. En el estudio de Tonelli *et al* publicado en 2018 sobre 1218 pacientes seguidos durante 2 años (134), se encontró que concentraciones bajas de selenio se asociaron fuerte e independientemente con mayor riesgo de muerte y de hospitalización (OR = 0,86 por decil, IC 99,2% 0,80 – 0,93). En una cohorte de 1041 pacientes en hemodiálisis, clasificados en cuartiles según el selenio sérico y seguidos durante 5 años, se encontró que el cuartil inferior tuvo mayor índice de mortalidad por cualquier causa y por enfermedad infecciosa que los otros 3 grupos ($p < 0,001$). Los índices de mortalidad cardiovascular o por neoplasia fueron similares en todos los conjuntos. Es el estudio de Fujishima y otros, de 2011 (135). En otra cohorte de 261 pacientes en hemodiálisis seguidos durante 5 años, trabajo de Kalousová y otros, de 2010, el selenio se comportó como predictor significativo de mortalidad cardiovascular y por cualquier causa en el

análisis univariado, pero no en el análisis multivariado, donde el retinol y la albúmina sí lo hicieron (116). En el estudio de Yang y otros, de 2012, siguieron a 111 pacientes en HD o DP durante 2 años. El selenio plasmático no fue predictor de mortalidad ni en el análisis univariado ni en el multivariado, donde sí lo fue el zinc sérico (136).

Así, del mismo modo que ocurre con los estudios sobre población general (18–20,137,138), los resultados de los análisis de la relación entre el selenio plasmático y la supervivencia de los enfermos renales son discordantes. Nuestros resultados van en consonancia con los de Fujishima, que agrupó a los pacientes según cuartiles de selenio plasmático, pero en su trabajo no se analizaron otras covariables, ni siquiera la edad de los pacientes.

En el estudio de Tonelli (134) no se empleó un análisis de supervivencia como la regresión de Cox, sino regresión logística, lo que impide una comparación directa con nuestros resultados. Encuentra diferencia significativa entre el decil de sujetos con selenio más bajo comparado con los deciles 2 a 9, después de ajustar por covariables como edad, sexo, comorbilidades y valores de laboratorio. Señala que hubo una mayor mortalidad en pacientes con selenio dentro del intervalo de referencia, incurriendo de nuevo este autor en el error de no emplear valores de referencia propios.

Los otros dos estudios valoraron el selenio como variable cuantitativa por lo que tampoco son directamente comparables al nuestro. La desventaja de ese enfoque es que, según se desprende de varios estudios en población general, la relación entre el selenio plasmático y la mortalidad no es lineal (12). Los valores más bajos de selenio se han asociado a una mayor mortalidad en población general o anciana, los valores próximos o en rango suficiente para posibilitar actividades normales de todas las selenoproteínas se han asociado a los riesgos de mortalidad más bajos y, con niveles superiores de selenio, se ha observado un aumento de la mortalidad. Por este motivo, es habitual la agrupación de los sujetos según cuartiles o tertiles de selenio plasmático y comparar el cuartil inferior con el resto.

En nuestro estudio, optamos por testar como valor de agrupación el límite inferior del intervalo de referencia poblacional. En base a este punto de corte objetivo, consideramos que un grupo de sujetos tenía hiposelenemia y comparamos su supervivencia a la del grupo con selenio en rango normal. Nuestros resultados indican que este punto de corte es adecuado para clasificar a los pacientes en grupos de riesgo de mortalidad diferenciado; es un punto de corte discriminante.

La elección del uso de selenio como variable dicotomizada aporta, además, facilidad de interpretación. En medicina, es habitual el uso de puntos de corte de biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y para otras tomas de decisiones: glucosa en el diagnóstico de Diabetes Mellitus, creatinina para la detección de fallo renal, troponina para el diagnóstico de síndrome coronario agudo, o albúmina en el seguimiento de los pacientes con ERC avanzada y para el diagnóstico de DPE. En todos estos casos el biomarcador no se emplea solo, sino que se combina con otros biomarcadores o ítems: una glucosa mayor de 200 mg/dL es diagnóstica de Diabetes Mellitus si además hay síntomas, o el diagnóstico de DPE requiere del cumplimiento de otros ítems además de la albúmina.

Nuestros resultados sugieren que el selenio bajo es un marcador de riesgo de mortalidad global, que la albúmina baja también lo es y que son marcadores independientes, lo que implica que la presencia simultánea de las dos alteraciones confiere mayor riesgo que si suceden en solitario. Del mismo modo, nuestros resultados sugieren que un paciente que tiene historia de enfermedad cardiovascular tiene mayor riesgo de mortalidad si tiene hiposelenemia concomitante. Cuando se analizó la interacción hiposelenemia-hipoalbuminemia en el análisis multivariado y ésta resultó no significativa, se demostró que la relación entre el selenio y la mortalidad no se ve modificada en su intensidad por la hipoalbuminemia y viceversa.

Los estudios epidemiológicos demuestran una fuerte asociación entre las medidas de desnutrición y de inflamación en pacientes en diálisis y la alta mortalidad. La existencia de desgaste proteico-energético se relaciona con mayor incidencia de enfermedad cardiovascular aterosclerótica, con baja calidad de vida y mayor tasa de hospitalización (70). Así, nuestra hipótesis de que la medida de selenio plasmático puede ser útil en el diagnóstico de DPE cobra fuerza con la asociación entre selenio y mortalidad que encontramos.

El selenio se comportaría como un marcador combinado de desnutrición y disminución de la capacidad antioxidante dado que representa fundamentalmente la suma de selenoproteína P, la glutatión peroxidasa 3 (GPx3), ambas enzimas con actividad antioxidante, y el selenio unido a albúmina presentes en el plasma (120–122). El selenio plasmático bajo también se asocia con una menor expresión de otras selenoproteínas en diversos tejidos. Dado que la hiposelenemia se comportó como predictor de mortalidad independiente de la albúmina, la disminución de la actividad de determinadas

selenoproteínas que conlleva esta hiposelenemia puede ser relevante en la evolución y el pronóstico de los enfermos renales.

De nuestros resultados se desprende la necesidad de llevar a cabo estudios de especiación del selenio en pacientes con ERC avanzada. El selenio total parece ser un marcador relevante en el seguimiento de estos pacientes, y alguna o varias selenoproteínas presentes en el plasma pueden ser marcadores superiores.

Se justifica, también, la realización de ensayos clínicos de suplementación de selenio en los pacientes con ERC e hiposelenemia. En población general, la mejora en el estatus de selenio es beneficiosa para la salud en varios aspectos para las personas con concentraciones de selenio en suero o plasma inferiores a 122 µg/L, sin riesgo adicional (12).

En base a nuestros resultados, recomendamos la monitorización del selenio plasmático en ERC avanzada para detectar a aquellos sujetos con riesgo elevado de mortalidad. Esta recomendación va especialmente dirigida a aquellos sujetos con hipoalbuminemia, puesto que la probabilidad de que presenten hiposelenemia es mayor.

8.CONCLUSIONES

8 Conclusiones

1. Se ha desarrollado un método de medición de selenio en suero y plasma en un equipo VARIAN, con modificador de matriz a base de nitratos de paladio y magnesio y adición de ácido ascórbico como reductor del paladio, lectura en altura de pico y calibración con estándares acuosos. El método desarrollado tiene adecuados límites de detección y cuantificación, intervalo de linealidad, exactitud y precisión.
2. Se ha optimizado el método de Julia Barciela (65) para determinación de selenio en suero y plasma en un equipo Perkin-Elmer, con modificador de matriz basado en nitrato de paladio y cloruro de hidroxilamina como reductor del paladio, lectura en área de pico y calibración con estándares acuosos. El método optimizado tiene adecuados límites de detección y cuantificación, exactitud y precisión.
3. El intervalo de referencia del selenio sérico o plasmático de la población adulta del área de Leganés es 63 – 118 $\mu\text{g/L}$. Los intervalos de confianza al 90% para los límites inferior y superior son 59 - 69 y 113 – 120, respectivamente. No son necesarios intervalos de referencia del selenio sérico o plasmático segregados ni por sexo ni por edad.
4. El selenio plasmático de los pacientes con enfermedad renal crónica avanzada es significativamente inferior al de los sujetos control (mediana 61,6 vs. 89,3 $\mu\text{g/L}$). El 52,0% de los pacientes tiene selenio plasmático por debajo del intervalo de referencia. En la subcohorte de pacientes en diálisis, este porcentaje es del 57,6%.
5. La supervivencia media estimada del grupo de pacientes con selenio plasmático inferior al intervalo de referencia del área geográfica fue significativamente menor a la del grupo con normo o hiperselenemia (46,2 meses vs. 61,8 meses, $p = 0,000$). En la subcohorte de pacientes en tratamiento sustitutivo, la supervivencia media estimada con hiposelenemia fue significativamente menor a la del grupo con normo o hiperselenemia (45,4 meses vs. 59,8 meses, $p = 0,000$). Se encuentra diferencia significativa también en el grupo de pacientes en prediálisis, con una menor

supervivencia de los pacientes con hiposelenemia en comparación con los pacientes con normo o hiperselenemia (55,7 vs. 67,1 meses).

6. En pacientes con enfermedad renal crónica estadios 4 y 5, la hiposelenemia tiene un HR de mortalidad de 2,585 (1,324 – 5,048), $p = 0,005$, según un modelo de Cox que incluye las covariables edad, tratamiento sustitutivo e historia de cardiopatía isquémica. En pacientes con ERC avanzada en tratamiento sustitutivo, la hiposelenemia tiene un HR de mortalidad de 2,952 (1,402 – 6,217), $p = 0,004$, según un modelo de Cox ajustado por edad, modalidad de diálisis e historia de enfermedad cardiovascular.
7. Se verificó el cumplimiento del criterio de riesgos proporcionales y la adecuación del modelo a los datos en todos los modelos obtenidos mediante regresión de Cox multivariada.
8. Los pacientes en tratamiento crónico con estatinas tuvieron un selenio plasmático significativamente superior al resto de pacientes (65,2 vs. 57,0 $\mu\text{g/L}$, $p = 0,010$). El tratamiento crónico con estatinas no predice la existencia de hiposelenemia en los enfermos renales en estadios 4 y 5 ($\text{OR} = 0,471$, $p = 0,081$).
9. El selenio plasmático tiene correlación positiva con los tres marcadores nutricionales estudiados en el grupo de pacientes en diálisis: creatinina ($\text{Rho} = 0,367$, $p = 0,001$), albúmina ($\text{Rho} = 0,440$, $p = 0,000$) y colesterol ($\text{Rho} = 0,278$, $p = 0,011$). No hay correlación significativa entre selenio y estos marcadores en población sana.
10. La clasificación de los pacientes en diálisis según el límite inferior de la normalidad del selenio plasmático lleva a dos poblaciones diferenciadas en el estado nutricional. El porcentaje de pacientes con hipoalbuminemia fue del 38,8% en el grupo de hiposelenemia y del 16,7% en el grupo de normoselenemia ($p = 0,027$). El porcentaje de pacientes con creatinina baja prediálisis también fue significativamente distinto (93,9% vs. 69,4%, $p = 0,003$).

11. Los pacientes en diálisis con albúmina inferior a 3,8 g/dL tienen mayor probabilidad de tener hiposelenemia que los que tienen albuminemia normal (OR = 3,579, p = 0,012).
12. En pacientes en tratamiento sustitutivo renal, tanto la hiposelenemia como la anemia y la hipoalbuminemia se relacionaron significativamente con una menor supervivencia en los análisis univariados (ajustados por edad). El HR de mortalidad con hiposelenemia fue de 3,403 (1,592 – 7,275), p = 0,002, en un modelo de Cox multivariado ajustado por edad e hipoalbuminemia. El selenio plasmático se comportó como un predictor de riesgo de mortalidad independiente de otros marcadores bioquímicos habituales en el control de estos pacientes.

9 Bibliografía

1. López-Bellido Garrido FJ, López Bellido L. Selenio y salud; valores de referencia y situación actual de la población española. *Nutr Hosp*. 2013;28(5):1396–406.
2. Fordyce F. Selenium Deficiency and Toxicity in the Environment. In: Selinus O, Alloway B, Centeno J, Finkelman R, Fuge R, Lindh U, et al., editors. *Essentials of Medical Geology*. Elsevier; 2005. p. 373–415.
3. Dumont E, Vanhaecke F, Cornelis R. Selenium speciation from food source to metabolites: A critical review. *Anal Bioanal Chem*. 2006;385(7):1304–23.
4. Rayman MP. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *Br J Nutr*. 2008;100(2):254–68.
5. Rayman MP, Infante HG, Sargent M. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. *Br J Nutr*. 2008;100(2):238–53.
6. Schubert A, Holden J, Wolf W. Selenium content of a core group of foods based on a critical evaluation of published analytical data. *J Am Diet Assoc*. 1987;87:285–299.
7. Lu J, Holmgren A. Selenoproteins. *J Biol Chem*. 2009;284(2):723–7.
8. Johansson L, Gafvelin G, Arnér ESJ. Selenocysteine in proteins - Properties and biotechnological use. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2005;1726(1):1–13.
9. Reeves MA, Hoffmann PR. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *cell mol life sci*. 2009;66(15):2457–78.
10. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(7):775–806.
11. Moghadaszadeh B, Beggs AH. Selenoproteins and their impact on human health through diverse physiological pathways. *Physiology (Bethesda)*. 2006;21:307–15.
12. Rayman MP. Selenium and human health. *Lancet* [Internet]. 2012;379(9822):1256–68. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61452-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61452-9)

13. Kryukov G V, Castellano S, Novoselov S V, Lobanov A V, Zehtab O, Guigó R, et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* (80-). 2003;300(5624):1439–43.
14. Huang Z, Rose AH, Hoffmann PR. The Role of Selenium in Inflammation and Immunity: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(7):705–43.
15. Yang GQ, Xia YM. Studies on human dietary requirements and safe range of dietary intakes of selenium in China and their application in the prevention of related endemic diseases. *Biomed Environ Sci*. 1995 Sep;8(3):187–201.
16. Thomson CD. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *Eur J Clin Nutr*. 2004;58(3):391–402.
17. WHO/FAO. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Second edition. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. 2004;
18. Akbaraly NT, Arnaud J, Hininger-Favier I, Gourlet V, Roussel AM, Berr C. Selenium and mortality in the elderly: Results from the EVA study. *Clin Chem*. 2005;51(11):2117–23.
19. Bleys J, Navas-Acien A, Guallar E. Serum selenium levels and all-cause, cancer, and cardiovascular mortality among US adults. *Arch Intern Med*. 2008;168(4):404–10.
20. Wei W-Q, Abnet CC, Qiao Y-L, Dawsey SM, Dong Z-W, Sun X-D, et al. Prospective study of serum selenium concentrations and esophageal and gastric cardia cancer, heart disease, stroke, and total death. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(1):80–5.
21. Combs GF. Current Evidence and Research Needs to Support a Health Claim for Selenium and Cancer Prevention. *J Nutr*. 2005;135:343–7.
22. Zhuo H, Smith AH, Steinmaus C. Selenium and lung cancer: a quantitative analysis of heterogeneity in the current epidemiological literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2004;13(5):771–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15159309>
23. Epplein M, Franke AA, Cooney R V., Morris JS, Wilkens LR, Goodman MT, et

- al. Association of Plasma Micronutrient Levels and Urinary Isoprostane with Risk of Lung Cancer: The Multiethnic Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2009;18(7):1962–70. Available from: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-09-0003>
24. Mahabir S, Forman MR, Dong YQ, Park Y, Hollenbeck A, Schatzkin A. Mineral intake and lung cancer risk in the NIH-American Association of Retired Persons Diet and Health study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(8):1976–83.
 25. Amaral AFS, Cantor KP, Silverman DT, Malats N. Selenium and Bladder Cancer Risk: a Meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2010;19(9):2407–15. Available from: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-10-0544>
 26. Peters U, Takata Y. Selenium and the prevention of prostate and colorectal cancer. *Mol Nutr Food Res*. 2008;52(11):1262–72.
 27. Etminan M, FitzGerald JM, Gleave M, Chambers K. Intake of selenium in the prevention of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes Control* [Internet]. 2005;16(9):1125–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16184479>
 28. Duffield-Lillico AJ, Reid ME, Turnbull BW, Combs GF, Slate EH, Fischbach L a, et al. Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev*. 2002;11(7):630–9.
 29. Lippman SM, Klein EA, Goodman PJ, Lucia MS, Thompson M, Ford LG, et al. Effect of Selenium and Vitamin E on Risk of Prostate Cancer and Other Cancers: The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA*. 2009;301(1):39–51.
 30. Flores-Mateo G, Navas-Acien A, Pastor-Barriuso R, Guallar E. Selenium and coronary heart disease: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2006;84(4):762–73.
 31. Alehagen U, Aaseth J, Johansson P. Reduced Cardiovascular Mortality 10 Years after Supplementation with Selenium and Coenzyme Q10 for Four Years: Follow-Up Results of a Prospective Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial

- in Elderly Citizens. PLoS One [Internet]. 2015;10(12):e0141641. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0141641>
32. Rayman MP. Selenoproteins and human health : Insights from epidemiological data. BBA - Gen Subj [Internet]. 2009;1790(11):1533–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.03.014>
 33. Levey AS, Inker LA. Definition and staging of chronic kidney disease in adults. UpToDate. 2015;1–26.
 34. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. Lancet [Internet]. 2012;379(9811):165–80. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60178-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60178-5)
 35. Martínez-Castelao A, Górriz-Teruel JL, Bover-Sanjuán J, Segura-de la Morena J, Cebollada J, Escalada J, et al. Documento de consenso para la detección y manejo de la enfermedad renal crónica. Nefrología [Internet]. 2014;34(2):243–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24658201>
 36. KDIGO. Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. Kidney Int. 2013;3(1):5–14.
 37. Fatehi P, Hsu C. Diagnostic approach to the patient with newly identified chronic kidney disease. UpToDate. 2015;1–11.
 38. Pérez-García R, Martín-Malo A, Fort J, Cuevas X, Lladós F, Lozano J, et al. Baseline characteristics of an incident haemodialysis population in Spain: results from ANSWER--a multicentre, prospective, observational cohort study. Nephrol Dial Transpl. 2009;24(2):578–88.
 39. Rosenberg M. Overview of the management of chronic kidney disease in adults. UpToDate. 2016;1–10.
 40. Bleyer A. Indications for initiation of dialysis in chronic kidney disease. UpToDate. 2015;
 41. Tattersall J, Dekker F, Heimbürger O, Jager KJ, Lameire N, Lindley E, et al. When to start dialysis: Updated guidance following publication of the Initiating Dialysis Early and Late (IDEAL) study. Nephrol Dial Transplant. 2011;26(7):2082–6.
 42. Schmidt R, Holley J. Overview of the hemodialysis apparatus. UpToDate. 2016;1–

- 21.
43. Misra M. The basics of hemodialysis equipment. *Hemodial Int.* 2005;9(1):30–6.
44. Martín-Malo A, de Francisco ALM. Dializadores y membranas de diálisis. *Nefrología.* 2012;7(1).
45. Ministerio de Sanidad y Consumo/Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias. Evaluación de los diferentes tipos de membranas de hemodiálisis. 1996.
46. Fernandez Lucas M, Teruel Briones JL. Técnicas de hemodiálisis. *Nefrología.* 2012;7(1).
47. Doñate T. Guías de diálisis peritoneal y la práctica diaria. *Nefrología.* 2005;25(Suplemento 2):33–8.
48. Carmona-Fonseca J. Selenio en suero y plasma: epidemiología y valores de referencia. *Rev Panam Salud Publica.* 2010;28(5):388–98.
49. Anadón Ruiz A, Palazón Bru I, Llorente Ballesteros MT, Gaspar Blázquez MJ. Medición del contenido de selenio en especímenes biológicos: aplicación en el laboratorio clínico. *Rev del Lab clínico.* 2018;
50. Montel Ruiz de Alda A, López Colón JL, de Prádena y Lobón JM. Metodología recomendada para la medición del contenido de selenio en especímenes biológicos. *Química Clínica.* 2002;21(2):67–73.
51. Seijas Martínez-echevarría M V. Determinación de Selenio en Suero por Espectrofotometría de Absorción Atómica. Universidad Complutense de Madrid; 1992.
52. Sabé R, Rubio R, Garc L. Determination of selenium in human blood specimens by electrothermal atomic absorption. 2000;419:121–35.
53. Daher R, Van Lente F. Concanavalin A-bound selenoprotein in human serum analyzed by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Clin Chem.* 1994;40(1):62–70.
54. Sheehan TM, Halls DJ. Measurement of selenium in clinical specimens. *Ann Clin Biochem.* 1999;36 (Pt 3):301–15.
55. CLSI. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical

- Laboratory; Approved Guideline—Third Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
56. Fernandez P. Determinación del tamaño muestral. *Cad Aten Primaria*. 1996;3(138–14):1–6.
 57. Gómez Piqueras C. Disociación/anonimización de los datos de salud. *Derecho y salud*. 2009;18(1):43–9.
 58. Schemper M, Smith TL. A Note on Quantifying Follow-up in Studies of Failure Time. 1996;346:0–3.
 59. López-Colón JL. Validación metodológica y cálculo de incertidumbres. Aplicación práctica en el caso de elementos traza. Comité de publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, editor. 2009.
 60. Trasobares Iglesias E, Gonzalez Estecha M, Olivan Osameela P, Arroyo Fernandez M. Nitrato de paladio – nitrato de magnesio como modificador de matriz único para la medición de plomo, cadmio y selenio por espectrometría de absorción atómica. *Rev del Lab clínico*. 2008;1 Extraord.
 61. Knowles MB, Brodie KG. Determination of Selenium in Blood by Zeeman Graphite Furnace Atomic Absorption. *Jounal Anal At Spectrom*. 1988;3(June):511–6.
 62. Savin N, White K. The Durbin-Watson Test foe Serial Correlation with Extreme Sample Sizes or Many Regressors. *Econometrica*. 1977;45(8):1989–96.
 63. Perich C, Minchinela J, Ricos C, Fernandez-Calle P, Alvarez V, Domenech MV, et al. Biological variation database: structure and criteria used for generation and update. *Clin Chem Lab Med*. 2015 Feb;53(2):299–305.
 64. Minchinela J, Ricós C, Perich C, Fernández-Calle P, Alvarez V, Doménech M, et al. Base de datos de los componentes de Variación Biológica, con las especificaciones de la calidad analítica (deseable, mínima y óptima). Actualización del año 2014. [http:// www.seqc.es/es/Comisiones/18/9/102](http://www.seqc.es/es/Comisiones/18/9/102) [Internet]. 2014 [cited 2019 Jan 15]. Available from: http://www.seqc.es/docs/Comisiones/Calidad_Analitica/Anexo_I-Especificaciones_de_calidad_DESEABLES_2014.pdf

65. Barciela García J. Selenio en medios biológicos. Especiación y biodisponibilidad de selenio en leche. Universidade de Santiago de Compostela; 1999.
66. Edward A. Sasse, Basil T. Doumas, W. Gregory Miller, Paul D'Orazio, John H. Eckfeldt, Susan A. Evans, Gary A. Graham, DABCC Gary L. Myers, Patrick J. Parsons, Noel V. Stanton MS. How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory ; Approved Guideline — Second Edition Serving the World ' s Medical Science Community Through Voluntary Consensus. Vol. 20. 2000. 59 p.
67. Harris EK, Boyd JC. On Dividing Reference Data into Subgroups to Produce Separate Reference Ranges. CLIN CHEM Clin Chem [Internet]. 1990 [cited 2017 Nov 16];362(2):265–70. Available from: <http://clinchem.aaccjnls.org/content/clinchem/36/2/265.full.pdf>
68. Delgado J, Pereira A, Villamor N, López-Guillermo A, Rozman C. Survival analysis in hematologic malignancies: Recommendations for clinicians. Haematologica. 2014;99(9):1410–20.
69. Bradburn M, Clark T, Love S, Altman D. Survival Analysis Part III: Multivariate data analysis – choosing a model and assessing its adequacy and fit. Br J Cancer [Internet]. 2003 [cited 2017 Dec 5];89:605–11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2376927/pdf/89-6601120a.pdf>
70. Fouque D, Kalantar-Zadeh K, Kopple J, Cano N, Chauveau P, Cuppari L, et al. A proposed nomenclature and diagnostic criteria for protein-energy wasting in acute and chronic kidney disease. Kidney Int. 2008;73(4):391–8.
71. K/DOQI. National Kidney Foundation; Clinical practice guidelines for nutrition in chronic renal failure. Am J Kidney Dis. 2000;35(6 Suppl 2):S1 S140.
72. KDIGO. Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease. Kidney Int Suppl. 2012;2(4).
73. KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). Kidney Int Suppl [Internet]. 2017;7:1–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.kisu.2017.04.001>
74. Long JA, Large RR, Lee MSY, Benton MJ, Danyushevsky L V., Chiappe LM, et

- al. Severe selenium depletion in the Phanerozoic oceans as a factor in three global mass extinction events. *Gondwana Res* [Internet]. 2016;36:209–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gr.2015.10.001>
75. Mechanick JI, Youdim A, Jones DB, Garvey WT, Hurley DL, McMahon MM, et al. Clinical practice guidelines for the perioperative nutritional, metabolic, and nonsurgical support of the bariatric surgery patient--2013 update: cosponsored by American Association of Clinical Endocrinologists, The Obesity Society, and American Society of Obesity (Silver Spring). 2013 Mar;21 Suppl 1(0 1):S1-27.
 76. Voth-Beach LM, Shrader DE. Investigations of a reduced palladium chemical modifier for graphite furnace atomic absorption spectrometry. *J Anal At Spectrom*. 1987;2(1):45–50.
 77. Shrader DE, Beach LM, Ridge P. Graphite Furnace AAS : Application of Reduced Palladium as a Chemical Modifier. *J Res Natl Bur Stand* (1934). 1988;93(3):450–2.
 78. Bermejo-Barrera P, Moreda-Pineiro J, Moreda-Pineiro A, Bermejo-Barrera A. Comparison of different chemical modifiers for the direct determination of arsenic in sea water by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Fresenius J Anal Chem*. 1996;355(2):174–9.
 79. Tsalev DL, Lampugnani L, D’Ulivo A, Petrov II, Georgieva R, Marcucci K, et al. Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of selenium in biological fluids with rhodium modifier compared with hydride generation atomic spectrometric techniques. *Microchem J*. 2001;
 80. Hoenig M, Dheere O. Evaluation of end-capped tubes for transverse heated graphite atomizer electrothermal atomic absorption spectrometry. *Mikrochim Acta*. 1995;119(3–4):259–64.
 81. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Principios de análisis instrumental*. 5th ed. Mc Graw Hill; 2001.
 82. Nève J. New approaches to assess selenium status and requirement. *Nutr Rev*. 2000;58(12):363–9.
 83. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet*. 2000;356(9225):233–41.

84. Combs GF. Selenium in global food systems. Br J Nutr [Internet]. 2001 [cited 2017 Dec 26];2001(85):517–47. Available from: https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/5A3CA2BDDDB191B5BF3556892C625FDCD/S0007114501000782a.pdf/selenium_in_global_food_systems.pdf
85. Sánchez C, López-Jurado M, Aranda P, Llopis J. Plasma levels of copper, manganese and selenium in an adult population in southern Spain: Influence of age, obesity and lifestyle factors. Sci Total Environ [Internet]. 2010;408(5):1014–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.11.041>
86. Marchante-Gayon JM, Sanchez-Uria JE, Sanz-Medel A. Serum and tissue selenium contents related to renal disease and colon cancer as determined by electrothermal atomic absorption spectrometry. J Trace Elem Med Biol. 1996 Dec;10(4):229–36.
87. Torra M, Rodamilans M, Montero F, Corbella J. Serum selenium concentration of a healthy northwest Spanish population. Biol Trace Elem Res [Internet]. 1997;58(1–2):127–33. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0030666611&partnerID=40&md5=7e00eaf9716adf7f684f7b93fe6509a0>
88. Sabé R, Rubio R, García-Beltrán L. Reference values of selenium in plasma in population from Barcelona. Comparison with several pathologies. J Trace Elem Med Biol. 2002;16(4):231–7.
89. Diaz Romero C, Lopez Blanco F, Henriquez Sanchez P, Rodriguez E, Serra Majem L. Serum selenium concentration in a representative sample of the Canarian population. Sci Total Environ. 2001 Mar;269(1–3):65–73.
90. Navarro M, Lopez H, Ruiz ML, Gonzalez S, Perez V, Lopez MC. Determination of selenium in serum by hydride generation atomic absorption spectrometry for calculation of daily dietary intake. Sci Total Environ. 1995 Dec;175(3):245–52.
91. Adame EM, Florea D, Pérez LS, López JM, Cruz a P De. Deficient selenium status of a healthy adult Spanish population. 2012;27(2):524–8.
92. Palazón Bru I. Asociación entre la concentración sérica de selenio y el perfil lipídico en una población infantil y adulta. Universidad Complutense de Madrid;

- 2016.
93. Timón Zapata J, Laserna Mendieta E, Sicilia Bravo L, Contreras Navarro L, Menchén Herreros A, Gómez-Serranillos Reus M. Establecimiento de los Valores Poblacionales de Selenio por Absorción Atómica Electrotérmica. In: V Congreso Nacional del Laboratorio Clínico. 2011.
 94. Alegría A, Barberá R, Clemente G, Farré R, García M, Lagarda M. Selenium and Glutathione Peroxidase Reference Values in Whole Blood and Plasma of a Reference Population Living in Valencia, Spain. *J Trace Elem Med Biol*. 1996;10:223–8.
 95. González Tarancón R, Romero Sánchez N, González Irazabal Y, Founaud Placer B, Valero Torres A, García Puga C, et al. Adecuación de los valores de referencia de selenio en suero en nuestro entorno geográfico. In: IX Congreso Nacional de Laboratorio Clínico. 2015.
 96. Neve J. Methods in determination of selenium states. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis*. 1991;5(1):1–17.
 97. Tonelli M, Wiebe N, Hemmelgarn B, Klarenbach S, Field C, Manns B, et al. Trace elements in hemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2009;7:25.
 98. Fujishima Y, Ohsawa M, Itai K, Kato K, Tanno K, Turin TC, et al. Serum selenium levels in hemodialysis patients are significantly lower than those in healthy controls. *Blood Purif*. 2011;32(1):43–7.
 99. Guo C-H, Wang C-L, Chen P-C, Yang T-C. Linkage of Some Trace Elements, Peripheral Blood Lymphocytes, Inflammation, and Oxidative Stress in Patients Undergoing Either Hemodialysis or Peritoneal Dialysis. *Perit Dial Int*. 2011;31(5):583–91.
 100. Pakfetrat M, Malekmakan L, Hasheminasab M. Diminished selenium levels in hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Biol Trace Elem Res*. 2010 Dec;137(3):335–9.
 101. Johnson-Davis KL, Fernelius C, Eliason NB, Wilson A, Beddhu S, Roberts WL. Blood enzymes and oxidative stress in chronic kidney disease: A cross sectional study. *Ann Clin Lab Sci*. 2011;41(4):331–9.

102. Tonelli M, Wiebe N, Bello A, Field CJ, Gill JS, Hemmelgarn BR, et al. Concentrations of Trace Elements in Hemodialysis Patients: A Prospective Cohort Study. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 2017;70(5):696–704. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2017.06.029>
103. Cesbron A, Sausseureau E, Mahieu L, Couland I, Guerbet M, Goulle J. Metallic Profile of Whole Blood and Plasma in a Series of 106 Healthy Volunteers. 2013;2003(Table I):401–5.
104. Zachara BA. Selenium and selenium-dependent antioxidants in chronic kidney disease. *Adv Clin Chem*. 2015;68:131–51.
105. Saint-Georges MD, Bonnefont DJ, Bourelly BA, Jaudon MC, Cereze P, Chaumeil P, et al. Correction of selenium deficiency in hemodialyzed patients. *Kidney Int Suppl*. 1989 Nov;27:S274-7.
106. Bonomini M, Forster S, De Risio F, Rychly J, Nebe B, Manfrini V, et al. Effects of selenium supplementation on immune parameters in chronic uraemic patients on haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 1995;10(9):1654–61.
107. Koenig JS, Fischer M, Bulant E, Tiran B, Elmadfa I, Druml W. Antioxidant status in patients on chronic hemodialysis therapy: impact of parenteral selenium supplementation. *Wien Klin Wochenschr*. 1997 Jan;109(1):13–9.
108. Adamowicz A, Trafikowska U, Trafikowska A, Zachara B, Manitius J. Effect of erythropoietin therapy and selenium supplementation on selected antioxidant parameters in blood of uremic patients on long-term hemodialysis. *Med Sci Monit*. 2002 Mar;8(3):CR202-5.
109. Zachara B a., Gromadzinska J, Palus J, Zbrog Z, Swiech R, Twardowska E, et al. The effect of selenium supplementation in the prevention of DNA damage in white blood cells of hemodialyzed patients: A pilot study. *Biol Trace Elem Res*. 2011;142(3):274–83.
110. Salehi M, Sohrabi Z, Ekramzadeh M, Fallahzadeh MK, Ayatollahi M, Geramizadeh B, et al. Selenium supplementation improves the nutritional status of hemodialysis patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(3):716–23.
111. Omrani HR, Rahimi M, Nikseresht K. The Effect of Selenium Supplementation on

- Acute Phase Reactants and Thyroid Function Tests in Hemodialysis Patients. *Nephrourol Mon* [Internet]. 2015;7(2):0–3. Available from: http://www.numonthly.com/?page=article&article_id=24781
112. Kalantar-Zadeh K, Ikizler TA, Block G, Avram MM, Kopple JD. Malnutrition-inflammation complex syndrome in dialysis patients: causes and consequences. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 2003;42(5):864–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajkd.2003.07.016>
 113. Carrero JJ, Stenvinkel P. Persistent inflammation as a catalyst for other risk factors in chronic kidney disease: A hypothesis proposal. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(SUPPL. 1):49–55.
 114. Gracia-Iguacel C, González-Parra E, Barril-Cuadrado G, Sánchez R, Egido J, Ortiz-Ardúan A, et al. Definiendo el síndrome de desgaste proteico energético en la enfermedad renal crónica: Prevalencia e implicaciones clínicas. *Nefrologia*. 2014;34(4):507–19.
 115. Akchurin OM, Kaskel F. Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif*. 2015;39(1–3):84–92.
 116. Kalousová M, Kubena A a, Kostířová M, Vinglerová M, Ing OM, Dusilová-Sulková S, et al. Lower retinol levels as an independent predictor of mortality in long-term hemodialysis patients: a prospective observational cohort study. *Am J Kidney Dis*. 2010;56(3):513–21.
 117. Sonikian M, Dona A, Skarakis J, Trompouki S, Miha T, Karatzas I, et al. The Role of Dialysis Membranes on Intradialytic Selenium Removal and on Selenium Status in Patients Receiving Renal Replacement Therapy. *Blood Purif*. 2016;41:94–9.
 118. Dworkin B, Weseley S, Rosenthal WS, Schwartz EM, Weiss L. Diminished blood selenium levels in renal failure patients on dialysis: correlations with nutritional status. *Am J Med Sci*. 1987 Jan;293(1):6–12.
 119. Zagrodzki P, Bartoń H, Walas S, Fołta M, Stompór T, Janusz-Grzybowska E, et al. Selenium status indices, laboratory data, and selected biochemical parameters in end-stage renal disease patients. *Biol Trace Elem Res*. 2007;116(1):29–41.
 120. Harrison I, Littlejohn D, Fell GS. Distribution of selenium in human blood plasma and serum. *Analyst*. 1996 Feb;121(2):189–94.

121. Ashton K, Hooper L, Harvey L, Hurst R, Casgrain A, Fairweather-tait SJ. Methods of assessment of selenium status in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2009;89(suppl):2025S–39S.
122. Letsiou S, Nomikos T, Panagiotakos DB, Pergantis SA, Fragopoulou E, Pitsavos C, et al. Gender-specific distribution of selenium to serum selenoproteins: associations with total selenium levels, age, smoking, body mass index, and physical activity. *Biofactors.* 2014;40(5):524–35.
123. Taccone-Gallucci M, Noce A, Bertucci P, Fabbri C, Manca-di-Villahermosa S, Della-Rovere FR, et al. Chronic treatment with statins increases the availability of selenium in the antioxidant defence systems of hemodialysis patients. *J Trace Elem Med Biol.* 2010;24(1):27–30.
124. Leonhardt W, Kurktschiev T, Meissner D, Lattke P, Abletshauser C, Weidinger G, et al. Effects of fluvastatin therapy on lipids, antioxidants, oxidation of low density lipoproteins and trace metals. *Eur J Clin Pharmacol.* 1997;53(1):65–9.
125. Ghayour-Mobarhan M, Lamb DJ, Taylor A, Vaidya N, Livingstone C, Wang T, et al. Effect of statin therapy on serum trace element status in dyslipidaemic subjects. *J Trace Elem Med Biol.* 2005;19(1):61–7.
126. Sena-evangelista KCM, Fatima L, Pedrosa C, Maria S, Cozzolino F, Espírito T, et al. The Hypolipidemic and Pleiotropic Effects of Rosuvastatin Are Not Enhanced by Its Association with Zinc and Selenium Supplementation in Coronary Artery Disease Patients : A Double Blind Randomized Controlled Study. *PLoS One.* 2015;1–14.
127. Yilmaz MI, Baykal Y, Kilic M, Sonmez A, Bulucu F, Aydin A, et al. Effects of statins on oxidative stress. *Biol Trace Elem Res.* 2004 May;98(2):119–27.
128. Bedi O, Dhawan V, Sharma PL, Kumar P. Pleiotropic effects of statins : new therapeutic targets in drug design. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* [Internet]. 2016;389(7):695–712. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-016-1252-4>
129. KDIGO. Clinical Practice Guideline for Lipid Management in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* 2013;3(3):182–9.
130. Sun L, Zou L, Chen M, Liu B. Meta-analysis of statin therapy in maintenance

- dialysis patients. *Ren Fail.* 2015 Aug;37(7):1149–56.
131. Moosmann B, Behl C. Selenoprotein synthesis and side-effects of statins. *Lancet.* 2004;363:892–4.
 132. Warner G, Berry M, Moustafa M, Carlson B, Hatfield D, Faust J. Inhibition of selenoprotein synthesis by selenocysteine tRNA[Ser]^{Sec} lacking isopentenyladenosine. *J Biol Chem.* 2000;275:28110–9.
 133. Moustafa ME, Carlson BA, El-Saadani MA, Kryukov G V, Sun QA, Harney JW, et al. Selective inhibition of selenocysteine tRNA maturation and selenoprotein synthesis in transgenic mice expressing isopentenyladenosine-deficient selenocysteine tRNA. *Mol Cell Biol.* 2001 Jun;21(11):3840–52.
 134. Tonelli M, Wiebe N, Bello A, Field CJ, Gill JS, Hemmelgarn BR, et al. Article Concentrations of Trace Elements and Clinical Outcomes in Hemodialysis Patients A Prospective Cohort Study. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2018;13(6):907–15.
 135. Fujishima Y, Ohsawa M, Itai K, Kato K, Tanno K, Turin TC, et al. Serum selenium levels are inversely associated with death risk among hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant [Internet].* 2011;26(10):3331–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21372251>
 136. Yang C-Y, Wu M-L, Chou Y-Y, Li S-Y, Deng J-F, Yang W-C, et al. Essential trace element status and clinical outcomes in long-term dialysis patients: a two-year prospective observational cohort study. *Clin Nutr [Internet].* 2012;31(5):630–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22405403>
 137. Kok FJ, de Bruijn AM, Vermeeren R, Hofman A, van Laar A, de Bruin M, et al. Serum selenium, vitamin antioxidants, and cardiovascular mortality: a 9-year follow-up study in the Netherlands. *Am J Clin Nutr.* 1987 Feb;45(2):462–8.
 138. Ray AL, Semba RD, Walston J, Ferrucci L, Cappola AR, Ricks MO, et al. Low serum selenium and total carotenoids predict mortality among older women living in the community: the women's health and aging studies. *J Nutr.* 2006;136(1):172–6.

10 Índice de tablas

Tabla 2-1. Concentraciones de selenio en suelos de distintas regiones.....	32
Tabla 2-2. Concentraciones de selenio en alimentos vegetales.....	34
Tabla 2-3. Resumen de selenoproteínas humanas	40
Tabla 2-4. Valores de ingesta diaria recomendada de selenio en adultos por diferentes países y organismos	44
Tabla 2-5. Ingesta mínima recomendada de selenio por rango de edad, OMS 2004	44
Tabla 2-6. Pronóstico y frecuencia de la monitorización de la ERC por FGe y albuminuria según KDIGO 2012	53
Tabla 2-7 Programas de temperaturas propuestos para la determinación de selenio total en suero por ETAAS.	61
Tabla 5-1. Programa de temperaturas de partida.....	81
Tabla 5-2. Temperatura del primer paso de secado	82
Tabla 5-3. Tiempo del primer paso de secado.....	82
Tabla 5-4. Temperatura del segundo paso de secado	83
Tabla 5-5. Tiempo del segundo paso de secado	83
Tabla 5-6. Cantidad de paladio añadida en cada medición.....	84
Tabla 5-7. Contenido en Tritón X-100 del modificador	85
Tabla 5-8. Absorbancia del fondo según temperatura de calcinación.....	85
Tabla 5-9. Absorbancia del estándar de 100 µg/L de selenio según temperatura de calcinación	85
Tabla 5-10. Tiempo del paso de calcinación.....	86
Tabla 5-11. Optimización de la temperatura de atomización.....	87
Tabla 5-12. Programa final de temperaturas	87
Tabla 5-13. Altura vs. área de pico.....	88
Tabla 5-14. Programa del muestreador para adición estándar	88
Tabla 5-15. Programa del muestreador para calibración acuosa	89

Tabla 5-16. Optimización de los tiempos del programa del horno con modificador de Pd y Mg	91
Tabla 5-17. Programa final del muestreador	93
Tabla 5-18. Estudio de linealidad	94
Tabla 5-19. Evaluación de la precisión y la exactitud	97
Tabla 5-20. Comprobación de la exactitud del método	99
Tabla 5-21. Programa de temperaturas de partida	100
Tabla 5-22. Optimización de la temperatura de calcinación	101
Tabla 5-23. Optimización de la temperatura de atomización	102
Tabla 5-24. Repetibilidad de un pool de plasmas	103
Tabla 5-25. Preparación de mezclas para adición estándar	104
Tabla 5-26. Preparación de estándares para calibración acuosa	104
Tabla 5-27. Evaluación de la precisión y la exactitud	106
Tabla 5-28. Comprobación de la exactitud del método	108
Tabla 5-29. Edad y sexo de los sujetos de la cohorte	115
Tabla 5-30. Modalidad de diálisis	116
Tabla 5-31. Localización cáncer	118
Tabla 5-32. Variables analíticas de distribución normal de la cohorte	119
Tabla 5-33. Variables analíticas de distribución no normal de la cohorte	119
Tabla 5-34. Características basales de los pacientes estratificados por hiposelenemia	125
Tabla 5-35. Hazard ratios para mortalidad por cualquier causa con hiposelenemia	126
Tabla 5-36. Hazard ratios ajustados por edad mediante análisis univariado y multivariado (modelo 3)	126
Tabla 5-37. Cálculo de los coeficientes del modelo con la variable de grupos de riesgo categorizados en tertiles para la estimación de la bondad de ajuste (modelo 3) ..	129
Tabla 5-38. Estimación de la pérdida de χ^2 con la eliminación de variables del modelo 3 en la regresión de Cox condicional “hacia atrás”	129

Tabla 5-39. Características basales de la subcohorte de tratamiento sustitutivo con y sin hiposelenemia	131
Tabla 5-40. Hazard ratios ajustados por edad mediante análisis univariado y multivariado (modelo B).....	133
Tabla 5-41. Cálculo de los coeficientes del modelo con la variable de grupos de riesgo categorizados en tertiles para la estimación de la bondad de ajuste (modelo B)..	135
Tabla 5-42. Estimación de la pérdida de χ^2 con la eliminación de variables del modelo B en la regresión de Cox condicional “hacia atrás”	136
Tabla 5-43. Tabla cruzada de hiposelenemia y tratamiento con estatinas	138
Tabla 5-44. Análisis de correlaciones bivariadas con el selenio plasmático	140
Tabla 5-45. Categorización de variables.....	142
Tabla 5-46. Frecuencias de alteraciones analíticas con y sin hiposelenemia.....	144
Tabla 5-47. Resultados de la regresión logística	144
Tabla 5-48. Hazard Ratios de mortalidad por cualquier causa según alteraciones analíticas (modelo 4)	145
Tabla 5-49. Cálculo de los coeficientes del modelo con la variable de grupos de riesgo categorizados en tertiles para la estimación de la bondad de ajuste (modelo 4) ..	147
Tabla 5-50. Estimación de la pérdida de χ^2 con la eliminación de variables del modelo 4 en la regresión de Cox condicional “hacia atrás”	148
Tabla 6-1. Valores de referencia de selenio en suero o plasma en distintas regiones españolas.....	154

11 Índice de figuras

Figura 2-1 Metabolismo del selenio en humanos. Modificado de Rayman <i>et al</i> (2008) (5).	36
Figura 2-2. Elementos requeridos para la incorporación de selenocisteína. Extraído de Moghadaszadeh <i>et al</i> (2006) (11).	38
Figura 2-3. Hazards ratio de mortalidad por cualquier causa ajustados por selenio sérico en la cohorte de NHANES III. Extraído de Rayman (2012) (12).....	47
Figura 2-4. Rangos de selenio en sangre y efectos en el metabolismo y la salud. Extraído de López-Bellido <i>et al</i> (2013) (1)	50
Figura 5-1. Representación de la recta de regresión lineal junto con valores de confianza de la media.....	95
Figura 5-2. Residuos de la recta de regresión	95
Figura 5-3. Selenio sérico de sujetos sanos.....	110
Figura 5-4. Selenio sérico de mujeres y hombres sanos del área geográfica.....	111
Figura 5-5. Selenio sérico de mayores y menores de 60 años del área geográfica	112
Figura 5-6. Diagrama de dispersión de selenio sérico y edad.....	112
Figura 5-7. Concentración de selenio por grupos.....	114
Figura 5-8. Hábito tabáquico.....	115
Figura 5-9. Causa de ERC.....	116
Figura 5-10. Meses en diálisis.....	117
Figura 5-11. Meses en diálisis por modalidad.....	117
Figura 5-12. Curva de Kaplan-Meier global de la cohorte	120
Figura 5-13. Causa del fallecimiento.....	121
Figura 5-14. Selenio plasmático en la cohorte de pacientes	122
Figura 5-15. Selenio plasmático en sujetos con y sin enfermedad renal crónica.....	123
Figura 5-16. Curva de Kaplan-Meier según existencia de hiposelenemia en la primera analítica	124

Figura 5-17. Curvas de mortalidad estimadas por Kaplan-Meier según existencia de hiposelenemia en la primera analítica.....	125
Figura 5-18. Función de riesgo de mortalidad por cualquier causa en la media de covariables con y sin hiposelenemia (modelo 3).....	128
Figura 5-19. Representación del logaritmo de la función de riesgo acumulado en cada estrato frente al tiempo (verificación modelo 3).....	129
Figura 5-20. Curvas de mortalidad estimadas por Kaplan-Meier según existencia de hiposelenemia en los pacientes en tratamiento sustitutivo.....	131
Figura 5-21. Función de riesgo de mortalidad por cualquier causa en la media de covariables con y sin hiposelenemia (modelo B).	134
Figura 5-22. Representación del logaritmo de la función de riesgo acumulado en cada estrato frente al tiempo (verificación modelo B).....	135
Figura 5-23. Selenio plasmático según tratamiento con estatinas.....	137
Figura 5-24. Recuento de casos de hiposelenemia por grupo.....	138
Figura 5-25. Diagrama de dispersión de selenio y albúmina en el grupo de pacientes	141
Figura 5-26. Diagrama de dispersión de selenio y colesterol en el grupo de pacientes	142
Figura 5-27 Diagrama de dispersión de selenio y creatinina en el grupo de pacientes	142
Figura 5-28. Función de riesgo de mortalidad por cualquier causa en la media de covariables con y sin hiposelenemia (modelo 4).....	146
Figura 5-29. Representación del logaritmo de la función de riesgo acumulado en cada estrato frente al tiempo (verificación modelo 4).....	147

12 Comunicaciones y publicaciones derivadas de la realización de esta tesis doctoral

Publicaciones en revistas científicas:

1. *El selenio y la desnutrición e inflamación. Estudio preliminar en enfermedad renal crónica avanzada.* Anadón Ruiz A, Martín Jiménez E, Lozano Fernández R, Seijas Martínez-Echevarría MV. Rev Lab Clin. 2019;12(1):20-26.

Comunicaciones a congresos:

1. *Determinación de los valores de referencia de selenio en suero en nuestra área geográfica.* Anadón A, Martín E, Herbello P, Bermejo P, Seijas V. X Congreso Nacional del Laboratorio Clínico. Zaragoza, octubre 2016.
2. *Serum Selenium Levels of Chronic Renal Failure Patients on Peritoneal Dialysis.* Anadón A, Jáñez R, Andrino A, Mena E, Seijas V, Hernando C. IFCC WorldLab – Euro Med Lab. Berlín, mayo 2011.
3. *Selenio en la Enfermedad Renal: Un Reto en la Atención de Calidad al Paciente Urémico.* Anadón A, Seijas V, Martínez R, Jáñez R, Andrino A, Hernando C. XIV Reunión de la Sociedad Española de Dirección y Gestión de los Laboratorios Clínicos. Sevilla, abril 2010.
4. *Niveles de Selenio en Pacientes con IRC en Diálisis Peritoneal del Área IX de Madrid.* Anadón A, Seijas V, Jáñez R, Martínez R, Andrino A, Hernando C. III Congreso Nacional del Laboratorio Clínico. Valencia, octubre 2009.
5. *Efecto del Ácido Ascórbico como Modificador en la Determinación de Selenio en Suero.* Anadón A, Seijas V, Lozano R, Martínez R, Jáñez R, Andrino A, Hernando C. III Congreso Nacional de Laboratorio Clínico. Valencia, octubre 2009.